

Entwicklung eines Expressionssystems für rekombinante Antikörper in mammalischen Zellen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Alexandra Selma Helene Hoch
aus Bergisch Gladbach

1. Referent:	apl. Professor Dr. Jürgen Bode
2. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
eingereicht am:	05.02.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am:	03.05.2010
Druckjahr 2010	

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Rekombinante Proteine“ der Forschungsabteilung der Firma Miltenyi Biotec GmbH durchgeführt. Mein besonders großer Dank gilt Frau Dr. Iris Bürger für die Betreuung des Projektes, die fachliche Unterstützung mit vielen guten Ideen in angeregten Diskussionen und die Korrektur des Manuskripts. Ebenfalls herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Ulf Bethke, durch den die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht wurde, und der mir jederzeit mit konstruktiver Kritik und aufbauenden Worten zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich Prof. Dr. Jürgen Bode danken. Sein stetes Interesse an meiner Arbeit, die guten Ideen und die jederzeitige Unterstützung meines Projektes, seine Begeisterung für die Wissenschaft und sein großes Engagement trotz bürokratischer Probleme haben wertvoll zu dieser Arbeit beigetragen und mich motiviert. Seine Mühe bei der Korrektur der Arbeit hat auch den Abschluss dieses Projektes zu einem erfolgreichen Ende gebracht.

Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel danke ich für das Koreferat und dafür, dass er zusammen mit Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode die Arbeit vor der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Braunschweig vertritt. Herrn Prof. Dr. Lang danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein großer Dank gilt den Kollegen bei der Miltenyi Biotec GmbH, die mich auf meinem Weg so zahlreich unterstützt haben: Mayke Busch, Dr. Erik Schneider, Kerstin Skopnik, Steffi Kattenbach, Susanne Höher-Peters und Simone Meidhof, die in verschiedenen Phasen der Arbeit wichtige Ansprechpartner waren. Meinen Büro-Kolleginnen und –Kollegen, mit denen ich viel lachen konnte und die immer ein aufbauendes Wort für mich hatten, danke ich für fachliche Diskussionen und Gespräche jeder Art. Ganz besonders danke ich Alina Nagel, die mir eine gute Freundin geworden ist.

Ein besonderer Dank gilt auch Sarah Hanselka und Corinna Schicker. Ohne eure großartige Hilfe in Labor und besonders Zellkultur wäre diese Arbeit noch an einer Sehnenscheiden-Entzündung gescheitert!

Der Studentengruppe der Miltenyi Biotec GmbH danke ich für angeregte Diskussionen und viele interessante Vorträge und wünsche allen Mitgliedern viel Erfolg für den Abschluss ihrer Arbeiten.

Auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe EPI von Prof. Dr. Jürgen Bode gilt mein Dank. Herrn Dr. André Oumard und Herrn Sören Turan für die praktische und fachliche Unterstützung und Bereitstellung von Materialien, und Frau Dr. Sandra Broll für ihre Aufmerksamkeit im entscheidenden Augenblick, viele nette Gespräche, so manch aufbauende Email und das freundschaftliche Verhältnis.

Mein herzlichster Dank gilt Ralf, der mit unerschütterlicher Geduld immer da ist, wenn ich ihn brauche, und mir Mut und Halt gibt. Mit ihm ist jeder Tag ein guter Tag.

Meinen Eltern möchte ich für alles danken, was sie für mich getan haben. Ihr bedingungsloses Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten machen mich zu dem, was ich bin und erfüllen mich mit großem Stolz. Ohne sie wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung	3
1.1 Zelllinienentwicklung zur rekombinanten Proteinproduktion	3
1.2 Konventionelle Generierung von Produzentenzelllinien	5
1.3 Expressionssteigerung durch S/MARs	9
1.4 Ortspezifische Rekombination	12
1.4.1 Cre/ <i>loxP</i> -Rekombinationssystem.....	13
1.4.2 FLP/ <i>FRT</i> -Rekombinationssystem	13
1.5 Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch	15
1.6 Antikörper als Zielproteine biopharmazeutischer Produktion.....	17
1.7 Selektion hoch-produzierender Zellklone.....	20
1.7.1 Das MACS®-System: Separation von Zielzellen aus heterogenen Populationen	23
2 Ergebnisse	26
2.1 Ziel der Arbeit	26
2.2 Generierung einer RMCE-kompatiblen Basiszelllinie	27
2.2.1 Identifikation einer geeigneten Zelllinie (serumfreie versus serumhaltiger Handhabung)	27
2.2.2 FACS-Sortierung zur Einzelzellklonierung.....	27
2.2.3 Endpunktverdünnung zur Einzelzellklonierung.....	29
2.2.4 Herstellung stabiler Transfektantenklone und genetische Analyse	30
2.3 Generierung einer Expressions- und Austauschkassette	31
2.3.1 Design des Selektionskonstruktes: Aufbau und Selektionsstrategie.....	31
2.3.2 Klonierung des Selektionskonstruktes	34
2.3.3 Nachweis der Markergen-Expression mittels transienter Transfektion.....	35
2.3.4 Herstellung stabiler Transfektantenklone.....	36
2.4 Generierung des Austauschkonstruktes	37
2.4.1 Design und Klonierung.....	37
2.4.2 Nachweis der Austauschgen-Expression mittels transienter Transfektion	39
2.5 Austauschbarkeit der <i>egfp-mhc</i> Expressionskassette gegen <i>hum. IgG1</i> -Gene mittels RMCE 40	
2.5.1 Selektionsstrategie für Kulturen mit erfolgreichem RMCE	43
2.5.1.1 Analyse von RMCE-Mischkulturen auf EGFP-Expression.....	43
2.5.1.2 Analyse von Subklonen nach RMCE	46
2.5.2 Identifikation eines positiven RMCE-Subklons aufgrund seiner Expressionseigenschaften	47
2.5.3 Analyse von 29.2D12-Subklonen auf Antikörper-Expression.....	48
2.5.4 Authentifizierung von potentiell RMCE-positiven Klonen auf genomischer Ebene	49
2.6 Charakteristika der identifizierten hum.IgG1-Expressionszelllinien	53
2.6.1 Spezifische Produktivität.....	53
2.6.2 RMCE II - Wiederholte Austauschbarkeit der Expressionskassette	55
2.6.2.1 Generierung des Austauschkonstruktes pExHygTk	55
2.6.2.2 RMCE II – Austausch der <i>hum. IgG1</i> -Antikörpergene gegen <i>hygk</i>	56
2.6.2.3 RMCE II - Analyse von Subklonen	58
2.7 Etablierung eines Anreicherungssystems für Antikörper-sezernierende CHO-Zellen mittels MACS®-Technologie – „Antibody CHO Capture System“	60
2.7.1 Identifikation geeigneter anti-CHO-Antikörper.....	61
2.7.2 Herstellung eines Kontroll-Konjugates.....	63
2.7.3 Analyse der Funktionalität der Fangmatrix.....	64
2.7.4 Identifikation eines geeigneten Detektionsantikörpers.....	66

Inhaltsverzeichnis

2.7.5	Titration der Beladung der Fangmatrix	67
2.7.6	„Antibody CHO Capture System“ zur Detektion und Anreicherung von Produzentenzellen	70
3	Diskussion	71
3.1	Auswahl einer geeigneten Expressionszelllinie.....	71
3.2	Was zeichnet die optimale genomische Lokation zur Gen-Expression aus?.....	73
3.3	Strategie zur Isolation eines RMCE-kompatiblen Produktionsklons.....	75
3.3.1	Das Selektionsprotein als Imitation des Zielproteins	77
3.3.2	Limitierender Faktor: Gen-Kopienzahl oder RMCE-Kompatibilität?	79
3.3.2.1	Kombination der RMCE-Strategie mit Gen-Amplifikationsmechanismen	80
3.4	RMCE I: Selektionsprotein versus Antikörper	82
3.4.1	Auswahl RMCE-kompatibler Klone nach phänotypischen Analysekrterien	84
3.5	RMCE II: Antikörper versus Selektionsmarker	85
3.6	Steigerung der Effizienz von RMCE	86
3.6.1	Erhöhung der Flp-Rekombinase-Aktivität	86
3.6.2	Positionseffekte und ihre Auswirkung auf RMCE-Effizienz.....	88
3.7	Ist RMCE für die industrielle Produktion geeignet?	90
3.7.1	Relevanz des RMCE für die Forschung.....	92
3.7.1.1	Multiplex-RMCE	92
3.8	Anwendung des „Antibody CHO Capture Systems“ zur Positiv-Selektion von hum.IgG1-Produzenten nach RMCE	94
3.9	Ausblick	96
4	Material und Methoden	100
4.1	Geräte	100
4.2	Material.....	101
4.2.1	Chemikalien.....	101
4.2.2	Verbrauchsmaterialien	103
4.2.3	Zellen.....	104
4.2.4	Bakterien (<i>E. coli</i>).....	104
4.2.5	Oligonukleotide und synthetisierte Fragmente	104
4.2.6	Vektoren	105
4.2.7	Enzyme	106
4.2.8	Kits	106
4.2.9	Antikörper und Antikörperkonjugate.....	107
4.2.10	Medien und Puffer für zellbiologische Methoden.....	108
4.2.11	Medien und Puffer für molekularbiologische Methoden	109
4.2.12	Puffer für biochemische Methoden	110
4.2.13	EDV	111
4.3	Molekularbiologische Methoden	111
4.3.1	Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheit.....	111
4.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	112
4.3.3	Reinigung von PCR-Fragmenten.....	113
4.3.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	113
4.3.5	Verdau doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	114
4.3.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	115
4.3.7	Dephosphorylierung.....	115
4.3.8	Generierung von Insertionsfragmenten durch Hybridisierung von Oligonukleotiden	115
4.3.9	Ligation.....	116
4.3.10	Kultivierung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	116
4.3.10.1	Herstellung von Kulturmedien.....	116
4.3.10.2	Herstellung von Agarplatten	116
4.3.10.3	Transformation von Bakterien.....	117
4.3.10.4	Übernachtskulturen (ÜNK)	117
4.3.11	Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	117

4.3.12	Gewinnung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	117
4.3.13	Präzipitation von DNA mit Ethanol.....	118
4.4	Zellkulturmethoden	118
4.4.1	Kultivierung von Zellen.....	118
4.4.2	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	118
4.4.3	Passagieren.....	119
4.4.4	Langzeitlagerung von Zellen	120
4.4.5	Gentransfermethoden	120
4.4.5.1	Transfektion mittels LipoTAXI Reagenz zur transienten Testexpression in COS1-Zellen..	120
4.4.5.2	Transfektion mittels Elektroporation.....	120
4.4.6	Selektion.....	121
4.4.7	Subklonierung mittels Endpunktverdünnung	121
4.4.8	Spezifische Produktionsrate	122
4.4.9	RMCE	122
4.5	Biochemische Methoden.....	123
4.5.1	Antikörper-Isotypisierung mittels IsoStrip.....	123
4.5.2	ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) zur quantitativen Bestimmung der Antikörperkonzentration.....	123
4.5.3	Southern Blot Analyse zur Bestimmung der Genkopienzahl	125
4.5.3.1	Präparation der Sonden	125
4.5.3.2	Transfer und Fixierung	125
4.5.3.3	Hybridisierung.....	126
4.5.3.4	Detektion	126
4.5.3.5	Stripping von Membranen und Reinkubation von Hybridisierungslösungen.....	127
4.5.4	Kopplung von PE-Antikörperkonjugaten	127
4.5.5	Immuncytochemische Färbung von Zellen.....	127
4.5.6	„Antibody CHO Capture System“	128
4.5.6.1	Detektion	128
4.5.6.2	Anreicherung	128
5	Abkürzungsverzeichnis	130
6	Literaturverzeichnis	133

Zusammenfassung

Im Interesse biopharmazeutisch produzierender Unternehmen steht die Entwicklung von Produktionszelllinien, die sich durch hohe, vorhersagbare und stabile spezifische Produktivitäten auszeichnen. 60-70% der Unternehmen nutzen Säugerzellen zur Proteinproduktion, da diese den regulatorischen Anforderungen am ehesten entsprechen. Um ökonomisch produzieren zu können, ist nach konventionellen Systemen zur Zelllinien-Etablierung eine sehr zeit- und arbeitsintensive analytische Prozedur nötig. Der Entwicklungsprozess ist für jedes rekombinante Zielprotein erneut durchzuführen und weder vorhersagbar noch standardisierbar.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer mammalischen Produktionszelllinie zur rekombinanten Antikörperproduktion unter Verwendung eines Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch-Systems. Dieses System sollte zur Etablierung einer isogenen Basiszelllinie genutzt werden, von der ausgehend verschiedene Antikörperketten mit vorhersagbaren Produktivitäten exprimiert werden können. Der Selektionsprozess sollte ein möglichst zielorientiertes Analyse-Verfahren zulassen. Um dies gewährleisten zu können, wurde ein Fusionsprotein entwickelt, welches eine murine IgG1-Antikörperkette imitiert, bei dem jedoch die variable Region durch das grün fluoreszierende Protein EGFP ersetzt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass damit sowohl die intrazelluläre Detektion mittels Durchflusszytometrie als auch die extrazelluläre Detektion des sezernierten Produkts mittels ELISA möglich war.

Als Expressionszelllinie wurde aufgrund von anstehenden Subklonierungs- und Sortierungsanalysen die robuste serumabhängige CHO-DG44-Zelllinie ausgewählt. Für stabile Transfektanten mit unbekannter Gen-Kopienzahl wurden RMCE-Experimente durchgeführt, in denen das *egfp-mhc*-Fusionsgen durch humanisierte IgG1-Antikörperketten ersetzt wurde. In der phänotypischen Selektionsphase konnten wenige RMCE-positive Klone identifiziert und anschließend auf genomischer Ebene verifiziert werden. Auffällig war der Mehrkopienstatus dieser Klone, der eine Erklärung für die geringe Effizienz des Kassettenaustausch-Systems liefert. Partiiell ausgetauschte RMCE-Kassetten konnten aufgrund der Stringenz der phänotypischen Analyse nicht identifiziert werden. Dies wird auch als Ursache für den nicht erfolgreichen Folge-RMCE angesehen, bei dem die humanisierten IgG1-Antikörperketten gegen ein Positiv-Negativ-Selektionsmarkergen (*hyg^{tk}*) ausgetauscht werden sollten. Die spezifischen Produktionsraten der mittels RMCE generierten hum.IgG1-Produzenten konnten mit Werten von maximal 1,5 pcd bestimmt werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde zudem das „Antibody CHO Capture System“ zur Anreicherung von Hochproduzenten etabliert. Eine Machbarkeit konnte für das System gezeigt, aber in Hinblick auf die hier generierten hum.IgG1-Produzenten vermutlich aufgrund der

Zusammenfassung

verhältnismäßig niedrigen Produktivitäten nicht bestätigt werden. Durch Optimierung des „Antibody CHO Capture Systems“ ist es denkbar, Hochproduzenten mit einer zusätzlich guten Sekretions-Kapazität zu selektionieren.

1 Einleitung

1.1 Zelllinienentwicklung zur rekombinanten Proteinproduktion

In den letzten Jahren stieg der Anteil monoklonaler Antikörper an den humanen Biopharmazeutika stetig. Sie werden häufig in Dosen eingesetzt, die 10- bis 100-fach höher sind, als es früher für rekombinante Protein-Pharmazeutika nötig war, womit eine immense Anforderung an die Prozessentwicklung gestellt wird.

Es gibt viele verschiedene Wirtszellen, die zur Produktion von rekombinanten Proteinen genutzt werden können. Als prokaryotische Zellkultursysteme sind beispielsweise *Escherichia coli* (Hockney, 1994; Makrides, 1996) und *Bacillus subtilis* (Bolhuis *et al.*, 1999) beschrieben. Auch niedere Eukaryoten wie die Hefen *Pichia pastoris* (Rosenfeld, 1999) oder *Saccharomyces cerevisiae* (Graf *et al.*, 2009) finden hier Verwendung. Neben Insekten- und Pflanzenzellkulturen (James und Lee, 2001; McBride *et al.*, 1995) kommen mit Tieren und Pflanzen auch transgene Organismen zur Anwendung (Gordon *et al.*, 1980; Larrick und Thomas, 2001; Verwoerd *et al.*, 1995). Es werden außerdem Versuche unternommen, zellfreie Expressionssysteme zu etablieren. Diese bestehen nur aus den Komponenten, die zur Proteinbiosynthese benötigt werden, und aus geeigneten Wirtssystemen aufgereinigt und teilweise optimiert wurden (Nathans *et al.*, 1962; Rattan und Kristensen, 1990; Shimizu *et al.*, 2001).

60-70 % der therapeutischen Proteine werden heute bereits in Säugerzellen produziert. Diese stellen also das wichtigste Produktionssystem rekombinanter Proteine und vor allem rekombinanter Antikörper dar. In Aspekten wie Proteinfaltung, -assemblierung und posttranslationalen Modifikationen sind sie deutlich besser geeignet als prokaryotische oder niedere eukaryotische Systeme (Jenkins und Curling, 1994; Wurm, 2004). Ein Teil der zur pharmazeutischen Proteinproduktion verwendeten Säugerzellen ist in Tabelle 1-1 aufgeführt.

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika
HEK-293	humane embryonale Nieren-Epithelzellen	
CHO-K1	chinesische Hamster-Ovar-Epithelzellen	
CHO-DUKX-B11	chinesische Hamster-Ovar-Epithelzellen	<i>dhfr</i> ^{+/−}
CHO-DG44	chinesische Hamster-Ovar-Epithelzellen	<i>dhfr</i> ^{−/−}
Sp2/0-Ag14	murine Myelomzellen	
NS0	murine Myelomzellen	Glutaminsynthetase-Defizienz
Hybridom	Fusion aus Myelomzellen und B-Lymphozyten, die einen spezifischen Antikörper exprimieren	

Tabelle 1-1: Beispiele für Säugerzelllinien zur rekombinanten Proteinproduktion (nach Makrides und Prentice, 2003).

Ein bevorzugt verwendetes Expressionssystem stellt die CHO-Zelllinie dar, die aus dem Ovar eines adulten chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) entwickelt wurde (Tjio und Puck, 1958). Viele Pharmaunternehmen bedienen sich Zelllinien, die daraus weiterentwickelt wurden, zur Produktion heterologer Proteine (Wurm, 2004).

Die Entwicklung von Zelllinien, die aufgrund ihrer spezifischen Produktivitäten eine ökonomische Eignung für die industrielle Produktion besitzen, bedarf aufwendiger Optimierungsprozesse. So ist die Produktivität der Zelle nicht nur abhängig vom Vektorkonstrukt und dessen Expressionskassette, sondern auch von der Anzahl der Transgen-Integrate und in besonderem Maß von der genomischen Position des Transgens und dessen Umfeld. Unter Verwendung von Insulatoren und ähnlicher Chromatinelemente kann die Abhängigkeit der effizienten Proteinproduktion vom chromosomalen Integrationsort abgeschwächt werden. Zusätzlich wird die Produktivität von Produzentenzellen durch Medien- und Prozessoptimierung gesteigert. Optimale Nährstoffversorgung und Kultivierungsprozesse resultieren in höheren Produktionsraten und Zelldichten und führen zu einer gesteigerten Ausbeute (Wurm, 2004).

Bei Systemen zur Produktion therapeutisch eingesetzter rekombinanter Proteine handelt es sich unter Anderem in Hinblick auf ihre Produktion und Aufreinigung um einen Spezialfall der Proteinproduktion. Antikörper und andere therapeutische Proteine müssen im großen Maßstab und wirtschaftlich produziert werden und daneben die richtige Affinität und Stabilität über den gewünschten Produktionszeitraum hinaus zeigen. Zusätzlich ist es sehr wichtig, dass sich die finalen Expressionsklone im geforderten Kultivierungssystem ohne Produktivitätsverlust kultivieren lassen. Das Kultivierungssystem unterliegt den internationalen Pharmagesetzen und den Richtlinien der FDA („Food and Drug Administration“) für therapeutische Produkte (Sharfstein, 2008). Im Sinne der

Patientensicherheit resultieren daraus Anforderungen zum einen an die Identität sowie Rückverfolgbarkeit, und zum anderen an den Produktionsprozess, der mit Monoklonalität und Stabilität der Klone die Kontinuität des Produktes gewährleistet.

1.2 Konventionelle Generierung von Produzentenzelllinien

Produzentenzelllinien werden konventionell generiert (Abbildung 1-1), indem das GOI („gene of interest“=Gen von Interesse) in Verbindung mit einem Selektionsmarkergen in die Expressionszellen eingebracht wird, wobei die Transfektionseffizienz teilweise stark schwankt und bei typischerweise 30 % liegt (Bishop, 1999; Xiong *et al.*, 2005). Nach Transfektion erfolgt eine Selektionsphase: Zellen, die das GOI und damit auch das Selektionsmarkergen in ihr Genom integriert haben, überleben, und untransfizierte Zellen oder solche, die das GOI nicht stabil ins Genom integriert haben, sterben. Per Endpunktverdünnung werden daraufhin Subklone generiert, die zum Teil im Hochdurchsatzverfahren auf ihre spezifischen Produktivitätsraten analysiert werden, um Hoch-Produzenten zu identifizieren. Diese werden expandiert, charakterisiert und einer Prozessoptimierung unterzogen, um anschließend zur Produktion im industriellen Maßstab eingesetzt werden zu können. Dieses Vorgehen muss für jedes Zielprotein erneut erfolgen. Besonders die Selektion der Hoch-Produzenten und der klonspezifische Optimierungsprozess stellen dabei einen sehr hohen zeitlichen und wirtschaftlichen Aufwand dar. Problematisch ist, dass die Integrationsstelle, die Anzahl der Integrate sowie die Effektivität der Gen-Expression an diesem Gen-Ort nicht vorhersagbar ist (Barnes *et al.*, 2003). Der Positionseffekt, der das Expressionsverhalten der Klone bestimmt, kann von einer heterogenen Produktivität bis zu einer kompletten Stilllegung der Expression der integrierten Transgene, dem so genannten „Gene-Silencing“, führen (Martin und Whitelaw, 1996).

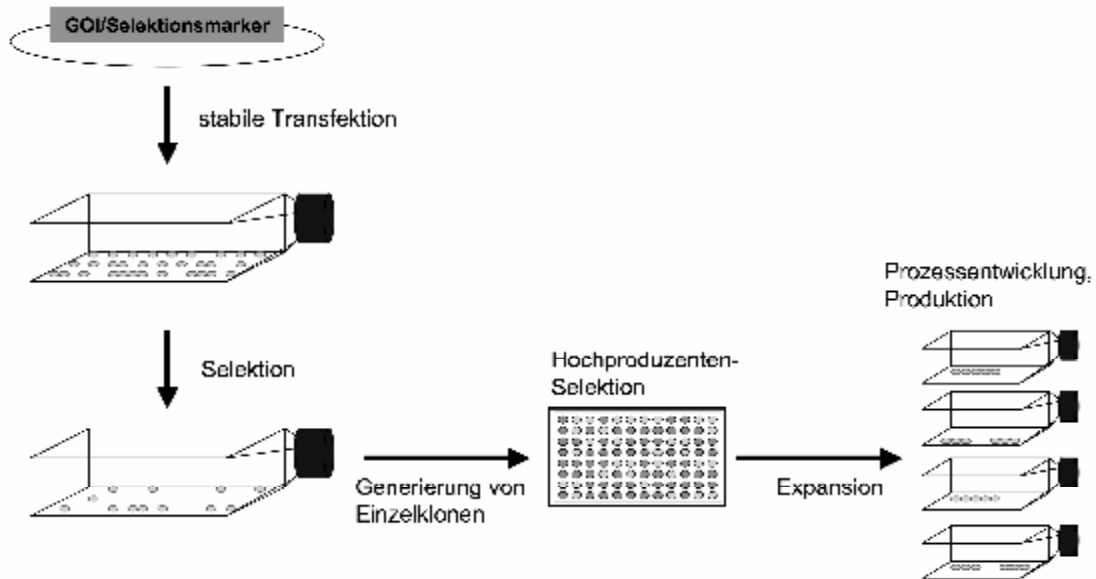


Abbildung 1-1: Konventionelles Vorgehen zur Generierung von Produzentenzelllinien. Die ausgewählte Wirtszelllinie wird mit einem Vektor, der das GOI („gene of interest“=Gen von Interesse) sowie ein Selektionsmarkergen enthält, transfiziert. Darauf folgt die Selektionsphase, in der Zellen, die das GOI und damit auch das Selektionsmarkergen in ihr Genom integriert haben, überleben, und die restlichen Zellen absterben. Die daraus resultierende Transfektanten-Mischkultur wird per Endpunktverdünnung subklontiert, und die Klone im Hochdurchsatzverfahren auf hohe spezifische Produktivitätsraten analysiert. Identifizierte Hoch-Produzenten werden dann einer Prozessoptimierung unterzogen und anschließend zur Produktion im industriellen Maßstab eingesetzt.

Viele industrielle Produktionszelllinien werden nach dem konventionellen System (Abbildung 1-1) unter zusätzlicher Verwendung eines Gen-Amplifikations-Systems generiert. Das DHFR-System beispielsweise, welches auf einer DHFR-defizienten CHO-Zelllinie basiert (Urlaub und Chasin, 1980b), ermöglicht initial eine Selektion über die Co-Transfektion des funktionellen *dhfr*-Gens und des GOI. Erfolgreich transfizierte Zellen wachsen im Gegensatz zu den restlichen Zellen im Hypoxanthin-/Thymidin-Mangelmedium, da sie durch die Transfektion eine wiederhergestellte DHFR-Enzymfunktion besitzen. Dadurch können sie Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat umwandeln, was für die *de novo* Synthese von Thymin und Purin benötigt wird, einhergehend mit einer Expression des GOI. Ihre DHFR-Aktivität kann wiederum durch das Folsäure-Analogon Methotrexat (MTX) kompetitiv und reversibel inhibiert werden, so dass sich die Kulturzellen nach Supplementierung des Mediums mit MTX aufgrund einer Hemmung der DNA-Synthese nicht weiter teilen. Einzelzellen, die eine deutlich erhöhte DHFR-Expression aufweisen, können die DNA-Synthese auch unter MTX-Selektion kompensieren und überleben den Prozess. So werden Zellen selektioniert, die entweder aufgrund einer hohen Gen-Expression an einem transkriptionell aktiven Gen-Ort

oder einer gesteigerten Gen-Kopienzahl von mehreren hundert bis tausend Kopien (Wurm *et al.*, 1986) in Anwesenheit von MTX proliferieren können. Dieses System kann über eine schrittweise Steigerung der MTX-Konzentration zu einer Anreicherung von Einzelzellen führen, die neben der stärkeren Expression des *dhfr*-Gens oftmals gleichzeitig eine gesteigerte Produktion des GOI besitzen (Kim *et al.*, 2001). Der Prozess ist jedoch sehr zeitaufwendig. Es werden ungefähr 12 Monate benötigt, um einen Hoch-Produzenten zu entwickeln.

Eine weitere, sehr stringente Methode zur Gen-Expression stellt das Glutamin-Synthetase (GS) Expressionssystem der Lonza AG dar (www.lonza.com). Es bietet einen entscheidenden Vorteil, da es nicht zwingend die Verwendung von spezifisch mutierten Zellen fordert (Bebbington *et al.*, 1992). CHO-Zellen besitzen zwar die endogene GS-Aktivität, können jedoch trotzdem unter Verwendung des GS-Enzym-Inhibitors Methionin-Sulphoximin (MSX) genutzt werden. NS0-Zellen werden allerdings aufgrund ihrer GS-Defizienz bevorzugt verwendet, da dies die Zugabe des zur Gen-Expression applizierten Inhibitors eliminiert. Die Glutamin-Synthetase katalysiert die Synthese von intrazellulärem Glutamin, so dass die Selektion der Transfektanten in Glutamin-freiem Medium abläuft. Ein zusätzlicher Vorteil ist dabei, dass solche Kulturen weniger toxisches Ammonium als Stoffwechsel-Nebenprodukt generieren, was die Glykosylierung und Proliferation weniger negativ beeinflusst. Die Gen-Amplifikation läuft in diesem System unter Applikation steigender MSX-Konzentrationen analog zum DHFR-System, jedoch werden hier Hoch-Produzenten selektiert, deren Produktivitäten schon mit vier bis zehn Gen-Kopien denen von DHFR-amplifizierten Klonen entsprechen. Aufgrund der höheren Stringenz des Systems kann außerdem die zur Entwicklung eines Hoch-Produzenten benötigte Zeit halbiert werden (Butler, 2005).

Abgesehen von diesen beschriebenen Gen-Amplifikations-Mechanismen werden andere Ansätze verfolgt, um Hoch-Produzenten-Zelllinien zu generieren. Einige basieren auf einer genetischen Modifikation des zellulären Metabolismus. Viele Entwicklungen greifen dabei in die Proteinbiosynthese oder Sekretionsmechanismen ein, um die Ausbeuten zu steigern (Becker *et al.*, 2008). Andere Ansätze zielen auf eine Unterdrückung der Apoptose hin, um die Anzahl der Produzentenzellen in Kultur und damit die Zelldichte steigern zu können (Mastrangelo *et al.*, 2000). Eine weitere Möglichkeit bietet ein biphasischer Produktionsprozess. Die Expansion der Produzentenzellen kann dabei unter energetisch günstigen Bedingungen sehr schnell ablaufen. Bei Erreichen der benötigten Zelldichte wird das Zellwachstum gestoppt und die Produktion des Zielproteins erst dann induziert (Kaufmann und Fussenegger, 2003).

Weiterhin werden zum Beispiel genetische Elemente genutzt, die das integrierte Plasmid befähigen, einen transkriptionell aktiven Gen-Ort unabhängig vom Integrationsort zu

generieren. Sie reduzieren den Effekt von Heterochromatin und lassen eine stabile und effiziente Expression des Transgens in einer euchromatischen Umgebung zu. Dies führt zu einer quantitativen und qualitativen Steigerung von Produzentenklonen in der Kultur. Hierzu werden häufig schützende cis-regulatorische Elemente wie z.B. Insulatoren (Bell *et al.*, 2001), „Scaffold/Matrix Attachment Regions“ (S/MARs; siehe 1.3); (Girod *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004) und „ubiquitous chromatin opening elements“ (UCOE, Antoniou *et al.*, 2003; Benton *et al.*, 2002) eingesetzt. Sie wirken, indem sie die co-transfizierten Gene gegen Positionseffekte abschirmen. Eine weitere Option bietet hierzu auch die Applikation von Natrium-Butyrat in der Zellkultur. Es inhibiert die Deacetylierung von Histonen (Cuisset *et al.*, 1998; Gorman *et al.*, 1983) und fördert damit den Zugriff der Proteinsynthese-Maschinerie auf die DNA.

Die Generierung von Hoch-Produzenten mit Expression von einem begünstigten Gen-Ort kann jedoch auch auf anderem Wege erfolgen. Dabei wird die genomische Position nicht mittels co-transfizierter Elemente optimiert. Es kann vielmehr gezielt eine genomische Lokation angesteuert werden, deren Eignung zur Produktion aufgrund vorangegangener Analysen bekannt ist. Prozesse, die eine zufällige Integration einer Transgen-Kassette und einen Selektionsprozess zur Identifikation guter Produzenten voraussetzen, werden durch ortsspezifische Rekombinationssysteme ermöglicht, auf die in 1.4 näher eingegangen wird. Die gezielte Integration vollständiger Gene in Positionen, die beispielsweise aufgrund von Genexpressions-Analysen als zur Expression geeignet bekannt sind, kann durch Zinkfinger-Nukleasen erfolgen (Moehle *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um Hybride von Zinkfinger-Proteinen mit der Restriktionsendonuklease *FokI*, welche die Spaltungsdomäne darstellt. Diese artifiziellen Restriktionsendonukleasen erlauben eine gezielte Ansteuerung ausgewählter Gen-Orte über die spezifische DNA-bindende Zinkfingerprotein-Domäne. Die Zinkfinger-Nukleasen führen einen Doppelstrangbruch in die Empfängersequenz ein. Eine exogene Reparaturmatrize (Donorsequenz) wird dann mittels Homologie-vermittelter Reparatur (HDR=“homology-directed repair“) in das Genom eingebracht (Liang *et al.*, 1998). Eine Integration von bis zu 8 Kilobasenpaaren (kb) langen Sequenzen (Moehle *et al.*, 2007) ist hierbei für die Genome verschiedener Spezies machbar, da die benötigten Reparaturmechanismen hoch konserviert sind (Hoeijmakers, 2001). Das System dieser modifizierten Zinkfinger-Nukleasen stellt einen Spezialfall der homologen Rekombination dar, ist dieser jedoch deutlich überlegen. Es vermittelt eine signifikant erhöhte Rekombinationseffizienz mit einer bis zu tausendfachen Stimulation der Gen-Integration (Porteus und Baltimore, 2003). Außerdem ist über Modifikationen der Zinkfinger-Domäne theoretisch jede beliebige DNA-Sequenz anzusteuern.

1.3 Expressionssteigerung durch S/MARs

Der Zellkern ist das Hauptmerkmal zur Unterscheidung zwischen Eukaryoten und Prokaryoten. Er enthält den größten Teil des genetischen Materials der eukaryotischen Zellen in Form von mehreren Chromosomen. Weitere Gene finden sich in den Mitochondrien und bei Pflanzen auch in Chloroplasten (Knippers, 2006). Wichtige Vorgänge, die innerhalb des Zellkerns ablaufen, sind DNA-Replikation und Transkription.

Die 3×10^9 Basenpaare (bp) der Erbsubstanz einer haploiden menschlichen Zelle hätten in ausgestrecktem Zustand eine Länge von ungefähr zwei Metern (Knippers, 2006). Um diese DNA in den nur einige Mikrometer großen Zellkern verpacken zu können, ist eine hochorganisierte Komprimierung nötig. Trotzdem muss die DNA sehr schnell zugänglich sein, damit die Proteinkomplexe und Komponenten der DNA-Replikation, -Reparatur, Rekombination und Proteinbiosynthese mit ihr interagieren können. In eukaryotischer DNA ist das genetische Material daher in einer komplexen Struktur aus DNA und basischen Proteinen organisiert, die gemeinsam das Chromatin bilden.

Chromatin lässt sich mikroskopisch in seine Kondensationsformen Euchromatin und Heterochromatin unterteilen (Yasminah und Yunis, 1974). Diese nehmen sowohl auf die strukturelle Organisation als auch auf die Gen-Expression Einfluss. Das Euchromatin dekondensiert in der Interphase (die Doppelstränge sind hier zum Teil enzymatisch zu parallelen Einzelsträngen aufgeteilt), ist zentral im Zellkern lokalisiert und enthält den Großteil der gesamten Genaktivität. Das Heterochromatin hingegen ändert seinen Kondensationsgrad nicht Zellzyklus-abhängig, sondern ist eher in der Peripherie des Zellkerns zu finden und steht für transkriptionell inaktive Gene. Konstitutives Heterochromatin besteht gewöhnlich aus repetitiven DNA-Elementen, fakultatives Heterochromatin kann hingegen teilweise auch aktive Gene enthalten (Dillon und Festenstein, 2002).

Die fundamentale Einheit des Chromatins bildet das Nukleosom (Kornberg, 1974; Kornberg und Thomas, 1974). Die 1,65-fache Windung von 146 Basenpaaren um ein Oktamer der Histone H2a, H2b, H3 und H4 resultiert in einer sechs- bis siebenfachen Verpackung. Sie bildet den Kern des Nukleosoms ("core particle", Richmond *et al.*, 1984) und hat zudem essentielle Bedeutung für die Gen-Expression.

Die überwiegend Lysin- und Arginin-reichen und damit positiv geladenen N-terminalen Enden der Histone binden an das negativ geladene Rückgrat der DNA-Phosphatreste. So wird die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren beschränkt, wodurch Histone neben der strukturgebenden auch eine wichtige regulatorische Funktion erhalten. Posttranslationale Histonmodifikationen am N-terminalen Ende umfassen Methylierung, Phosphorylierung,

Sumoylierung, Ubiquitinylierung und Acetylierung und können das Chromatingerüst des Zellkerns verändern. Sie haben damit zusätzlichen Einfluss auf die Genregulation und werden daher auch als Histon-Code bezeichnet (Jenuwein und Allis, 2001).

Die best-charakterisierte Modifikation ist die Acetylierung von Lysinresten. Durch Acetyltransferasen wird deren positive Ladung entfernt. Die dadurch bedingte Strukturänderung der Nukleosomen sorgt damit für die Freigabe von genetischer Information, die vorher nicht zugänglich war. Der Acetylierungsstatus wird durch das Gleichgewicht von Histon-Acetyltransferasen (HATs) bzw. Histon-Deacetylasen (HDACs) bestimmt. Inhibitoren für Histon-Deacetylasen sind z.B. Trichostatin A, Natrium-Butyrat oder -Valproat, die zu einer Dominanz der Histon-Acetyltransferasen führen. Die resultierenden hyperacetylierten Histone bilden Komplexe mit der DNA, die zu einer Entwindung führen und dadurch die DNA für regulatorische Faktoren besser zugänglich machen (Vidali *et al.*, 1978). Im Gegensatz dazu ist die Methylierung der Aminotermini der Histone bekannt für ihre Funktion in der epigenetischen Inaktivierung von Genen. Heterochromatin zeichnet sich vor allem durch Hypoacetylierung der Histone H3 und H4 sowie Methylierung des Lysin 9 am Histon H3 aus (Jenuwein, 2001; Richards und Elgin, 2002), wohingegen die Histon-Hyperacetylierung typisch für Euchromatin ist, welches transkriptionell hochaktiv ist. Dabei führt die Acetylierung der Histone H3 und H4 am Lysinrest zu einer Abschwächung der Bindungsstärke im DNA-Histon-Komplex (Bode *et al.*, 1986; Wolffe und Pruss, 1996).

Die nicht-Histon-assoziierte DNA, die benachbarte Nukleosomen verbindet, kann je nach Spezies und Zelltyp unterschiedlich lang sein und wird als Linker-DNA (internukleosomale Region) bezeichnet. Daher kann die Gesamtlänge der DNA in einem Nukleosom zwischen 160 und 241 bp variieren. Das Histon H1 bindet unmittelbar neben den Nukleosomen an die DNA und vermittelt die nächst höhere Verpackungseinheit der DNA. Es wird benötigt, um die 30 nm-Faser zu bilden, die als übergeordnete Struktur zu einer Erhöhung der Komprimierung des DNA-Moleküls um Faktor 40-50 führt (Argos *et al.*, 1986). Diese 30-nm-Fasern liegen jedoch nicht ungeordnet im Zellkern, sondern sind in Schleifen organisiert, die jeweils DNA-Abschnitte von bis zu 200 kb umfassen und mit ihrer Basis, den S/MARs, an Kernmatrixstrukturen fixiert sind (Gasser und Laemmli, 1987).

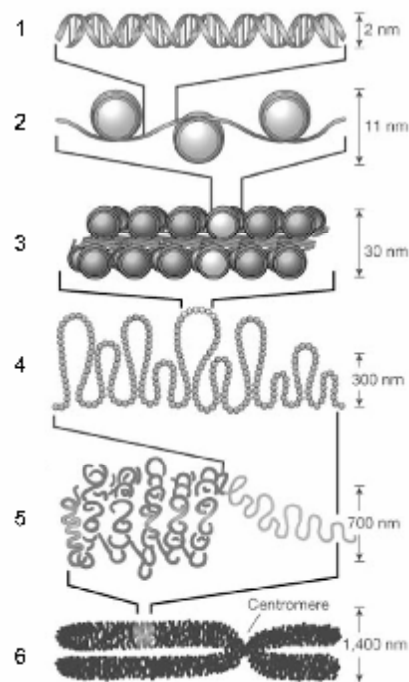


Abbildung 1-2: Organisation der DNA im Chromatin. Das niedrigste Organisationsniveau der DNA (1) stellt das Nukleosom (2) dar, in dem sich 165 Basenpaare der Superhelix in einer zweifachen Windung um ein Histonoktamer gewunden sind. Nukleosomen sind miteinander durch die Linker-DNA verbunden und falten sich in der nächsten Kondensationsstufe mit Hilfe des Histon H1 zu 30-nm-Fasern (3), die dann weiter zu Schleifen verdichtet werden (4,5), die an ihrer Basis an der Kernmatrix fixiert sind („Scaffold/Matrix Attachment Regions“), bis sie als Chromosom vorliegen (6) (aus Alberts *et al.*, 1998).

Das proteinöse intranukleäre Netzwerk wird als Kernmatrix (Berezney und Coffey, 1974) oder Kerngerüst (Mirkovitch *et al.*, 1984) bezeichnet und vermittelt die Organisation des Zellkerns. Ursprünglich wurde die Kernmatrix als Netzwerk beschrieben, welches nach selektiver Extraktion der Histone und der DNA von den Chromatin-Schleifen vorliegt (Berezney und Coffey, 1974). Sie enthält neben strukturgebenden Proteinen wie den Laminen A-C (Luderus *et al.*, 1992; 1994) und RNA auch regulatorische Komponenten wichtiger nukleärer Prozesse wie DNA-Replikation, sowie Transkription, Rekombination, RNA-Prozessierung und -Transport, Signaltransduktion sowie Apoptose (Berezney *et al.*, 1995). Zu diesen Komponenten gehören die Enzyme DNA-Polymerase α und β (Foster und Collins, 1985), die RNA-Polymerase II (Lewis *et al.*, 1984), die DNA-Methyltransferase (Burdon und Lees, 1985), Histondeacetylasen und Acetyltransferasen (Hendzel *et al.*, 1991; 1994). Ein weiteres Enzym, das sowohl strukturgebend als auch regulatorisch funktionell, und im hohen Maß in der Kernmatrix vertreten ist, ist die Topoisomerase II (Berrios *et al.*, 1985; Gasser *et al.*, 1986; Mirkovitch *et al.*, 1988). Sie löst durch die Einführung von

Doppelstrangbrüchen topologische Spannungen der DNA und hat somit Einfluss auf deren Struktur und die Zugänglichkeit für die oben beschriebenen Kernmatrix-assoziierten Enzyme. Die Proteine SAF-A (de Belle *et al.*, 1998) und SATB1, die an Prozessen der RNA-Verpackung und -Splicing oder an der DNA-Methylierung beteiligt sein können, binden *in vivo* an bestimmte DNA-Sequenzen, die während der Interphase eine Verankerung der DNA mit der Kernmatrix vermitteln und so auch für die Schleifenbildung des Chromatins verantwortlich sind (Fackelmayer *et al.*, 1994). Auf DNA-Ebene wird die Assoziation mit der Kernmatrix über die so genannten „Scaffold/Matrix Attachment Regions“ (S/MARs) vermittelt (Cockerill und Garrard, 1986; Paulson und Laemmli, 1977). S/MAR-Elemente umfassen 300 bis 3000 Basenpaare mit einem AT-Gehalt von ungefähr 70 % (Liebich *et al.*, 2002). Es gibt keine Konsensussequenz, aber alle S/MARs besitzen eine hohe Tendenz zur Strangtrennung. Sie beinhalten oft Sequenzen, die der Ziel-Konsensussequenz der Topoisomerase II ähneln (Bode *et al.*, 2000a), d.h. so genannte „base unpairing regions“ (BUR, Bode *et al.*, 1992). Dieses Motiv dient als Grundlage von Computer-gestützten Vorhersageprogrammen für S/MAR-Sequenzen, wie SIDD (Stress-Induced Duplex Destabilization Profile, Benham *et al.*, 1997), MAR-Finder (Singh *et al.*, 1997) und SMARScan (Girod *et al.*, 2007).

1.4 Ortsspezifische Rekombination

Rekombination ist der physikalische Austausch zwischen DNA-Molekülen und erfolgt in Eukaryoten während der Mitose als einer der generellen Mechanismen der DNA-Reparatur. In der Meiose führt sie zum Austausch zwischen verschiedenen Chromosomen („crossover“) und damit zu neuen genetischen Kombinationen. Im Falle der homologen oder allgemeinen Rekombination kommt es zu einem Austausch zwischen längeren homologen Sequenzen. Bei den Mechanismen der ortsspezifischen Rekombination handelt es sich um Systeme aus Prokaryoten und niederen Eukaryoten, die eine Rekombination zwischen kurzen, spezifischen Sequenzpaaren ermöglichen. Dieses äußerst effiziente System wurde erfolgreich auf höhere Eukaryoten übertragen, und kann daher auch zur Genommodifikation von ES-Zellen, transgenen Mäusen, Zelllinien, Pflanzen, Hefen und *Drosophila* eingesetzt werden (Übersicht in Bode *et al.*, 2000a). Die meistverwendeten Rekombinationssysteme leiten sich von den Rekombinasen Cre („Causes recombination“) des Phagen P1 und Flp (Flippase), der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ab, die beide zur Integrase-Familie der ortsspezifischen Rekombinasen gehören (Argos *et al.*, 1986).

1.4.1 Cre/*loxP*-Rekombinationssystem

Das Cre/*loxP*-Rekombinationssystem stammt aus dem Bakteriophagen P1 und dient der Trennung der bei der Replikation entstehenden Phagenplasmid-Dimere in *Escherichia coli*. Die Erkennungssequenz der 38 kDa großen Cre-Rekombinase ist die 34 bp lange *loxP*-Erkennungsstelle („locus of crossover (x) in P1“). Diese besteht aus einem 8-bp-umfassenden Spacer, der von zwei invers orientierten 13 bp langen Sequenzen flankiert wird. Diese inversen Sequenzen stellen die Bindungsstellen der Rekombinase dar (Abremski *et al.*, 1983; Hoess *et al.*, 1984; 1982). Die Orientierung der *loxP*-Erkennungsstelle ergibt sich durch ihre Asymmetrie.

Da für die Cre-vermittelte Rekombination keine Co-Faktoren benötigt werden, ist das Cre/*loxP*-System auch auf andere Organismen übertragbar. So kann es zum „Gene-targeting“ in ES-Zellen (Schübeler *et al.*, 1997) und zum konditionellen „knockout“ von Genen sowie der Deletion von Selektionsmarkern in transgenen Mäusen (Kuhn und Schwenk, 1997; Nagy, 2000) verwendet werden. Es existieren auch Systeme zur induzierbaren Expression der Cre-Rekombinase *in vivo*, die es ermöglichen, Gene mit letalen Effekten z.B. in Entwicklungsstudien zeitlich begrenzt zu exprimieren. Dies ist außerdem in einigen Anwendungen nötig, da sich sowohl in Hefe (Sauer, 1992; 1996) als auch im mammalischen Genom kryptische *loxP*-Erkennungsstellen finden, durch die es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer illegitimen Rekombination kommen kann (Schmidt *et al.*, 2000; Thyagarajan *et al.*, 2000). Dies führt zum Beispiel in Maus-Spermatiden unabhängig von exogenen *loxP*-Erkennungsstellen zu Chromosomen-Rearrangements (Schmidt *et al.*, 2000).

1.4.2 Flp/*FRT*-Rekombinationssystem

Die meisten Hefestämme besitzen mit dem so genannten 2 μ -Plasmid auch die Komponenten des Flp/*FRT*-Systems. Das 6318 bp große Plasmid kommt in hoher Kopienzahl vor und besitzt zwei 599 bp lange invertierte Sequenzwiederholungen. Innerhalb dieser Bereiche befindet sich je eine Erkennungsstelle der vom Plasmid kodierten, 43 kDa großen Flp-Rekombinase, wobei diese Erkennungsstellen als *FRT*-Erkennungsstellen („Flp-recombinase recognition target“) bezeichnet werden (Abbildung 1-3). Der „flip-flop-Inversionsmechanismus“ ist für den Namen des Enzyms verantwortlich (Broach und Hicks, 1980). Im 2 μ -Plasmid führt die ortsspezifische Rekombination zwischen diesen *FRT*-

Erkennungsstellen während der Replikation des Plasmids zur Bildung von Plasmid-Konkatemeren, die anschließend durch homologe oder Flp-vermittelte Rekombinationsprozesse wieder in Monomere aufgeteilt werden (Volkert *et al.*, 1989). Die *FRT*-Erkennungsstelle besteht aus einer 8 bp langen, asymmetrischen „Spacer“-Region, drei 13 bp langen Sequenzwiederholungen und einem zusätzlichen Basenpaar. Der Spacer gibt, wie auch bei den *loxP*-Erkennungsstellen, die Orientierung der Erkennungsstelle an. Die dritte Sequenzwiederholung des 13 bp-Fragmentes vermittelt eine gute Rekombinationseffizienz, ist aber für die energetisch bevorzugte Exzisionsreaktion (Abbildung 1-4) nicht essentiell (Senecoff und Cox, 1986). Die Flp-Rekombinase bindet an den beiden flankierenden invertierten Sequenzwiederholungen, der eigentliche Rekombinationsvorgang findet aber innerhalb der Spacer-Sequenz statt. Das zusätzliche Basenpaar bedingt, dass ein Einführen der *FRT*-Erkennungsstelle nicht zu einer Leserahmen-Verschiebung und damit nicht zum Translations-Stop führt, was sie für verfeinerte Rekombinations-Strategien nutzbar macht.

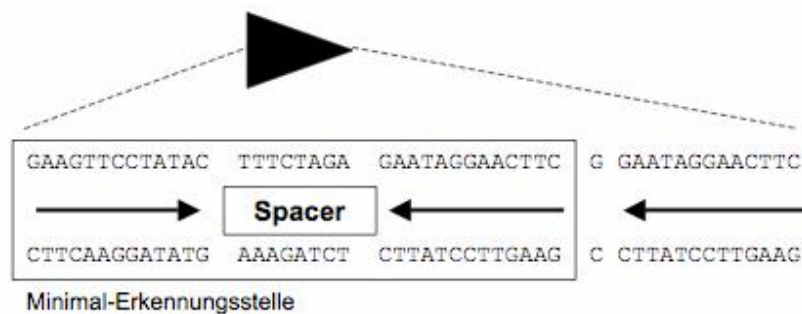


Abbildung 1-3: Aufbau der *FRT*-Erkennungsstellen. Dargestellt sind die Bestandteile der *FRT*-Erkennungsstelle (schematisch: Pfeilspitze) mit dem Spacer, der von den drei 13 bp langen Sequenzwiederholungen (=Pfeile) umgeben ist. Eingrahmt ist die für Exzisionsreaktionen ausreichende Minimalerkennungsstelle bestehend aus dem Spacer und den flankierenden Sequenzwiederholungen.

Das Flp/*FRT*-System wird im Gegensatz zu dem früher eingeführten Cre/*loxP*-System seltener verwendet, besitzt aber einige Vorteile: sowohl in Hefe als auch im mammalian Genom finden sich kryptische *loxP*-Erkennungsstellen, durch die es *in vitro* und *in vivo* zu einer illegitimen Rekombination kommen kann. Für *FRT*-Erkennungsstellen ist dies nicht bekannt (Thyagarajan *et al.*, 2000). Zusätzlich ermöglichen die durch Punktmutation im Spacer-Bereich etablierten heterospezifischen *FRT*-Erkennungssequenzen (Schlake und Bode, 1994) die Anwendung von Rekombinase-vermitteltem Kassettenaustausch

(RMCE=“recombinase-mediated cassette exchange“), der ein wichtiges Instrument für die Zelllinien-Entwicklung darstellt und im Folgenden beschrieben wird.

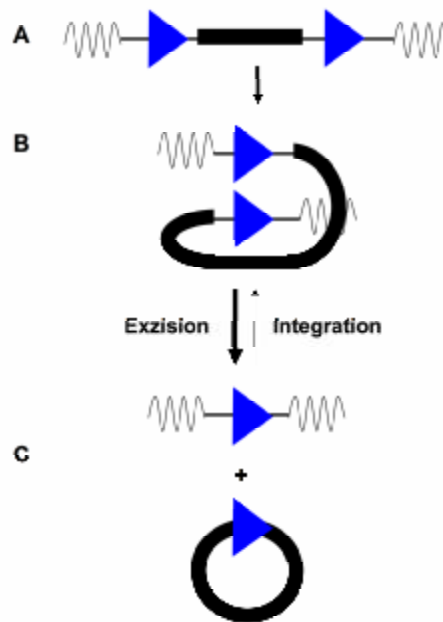


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Exzision bzw. der sequenzspezifischen Integration (nach Bode et al., 2003b). Die Genkassette, die durch identische *FRT*-Erkennungsstellen flankiert ist, liegt genomisch etabliert vor (A). Die FLP-Rekombinase katalysiert die Rekombination der *FRT*-Erkennungsstellen, die sich aneinander anlagern (B). Dabei wird der flankierte Bereich aus dem Genom entfernt (Exzisionsreaktion) und liegt, zusammen mit einer der *FRT*-Erkennungsstellen, extrachromosomal vor (C). Die umgekehrte Reaktion (Integrationsreaktion, von C über B nach A) kommt ebenfalls vor, ist jedoch energetisch weniger begünstigt.

1.5 Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch

Wie in 1.2 erläutert, ist der konventionelle Prozess zur Generierung von stabilen Expressionszelllinien, der auf der zufälligen Integration des GOI ins Genom basiert, nicht vorhersagbar, aufwendig und zeitintensiv. Alternativ werden daher häufig ortsspezifische Rekombinationssysteme verwendet, die den Aufwand der wiederholten Produzentenzellen-Selektion und der Prozessoptimierung deutlich reduzieren. Sie erlauben den Zugriff auf eine einmalig isolierte und charakterisierte isogene Produktionszelllinie für jedes weitere Zielprotein.

Der RMCE ermöglicht es, ein beliebiges GOI in eine vordefinierte genomische Lokation einer bereits charakterisierten Zelllinie zu integrieren. Die zur vorangegangenen Selektion der Zelllinie verwendeten Reportersysteme können dabei vollständig eliminiert werden, was einen großen Vorteil gegenüber Integrationssystemen wie dem kommerziell erhältlichen Flp-In™ System (Invitrogen) bietet, bei dem das gesamte Selektionskonstrukt nach Insertion über eine einzelne *FRT*-Erkennungsstelle im Genom erhalten bleibt. Ein Kassettenaustausch ist allerdings nur möglich, wenn die Erkennungsstellen der Rekombinase, die das auszutauschende Gen flankieren, heterospezifisch sind. Dies bedeutet, dass sie nicht miteinander, wohl aber mit ihrer identischen Erkennungsstelle in Wechselwirkung treten und rekombinieren können.

RMCE unter Verwendung des Flp/*FRT*-Systems wurde von Schlake und Bode (Schlake und Bode, 1994) entwickelt und sowohl in Kulturzellen (Baer und Bode, 2001; Lauth *et al.*, 2002) als auch in ES-Zellen (Cesari *et al.*, 2004; Seibler *et al.*, 1998) und Pflanzenzellen (Nanto *et al.*, 2005) erfolgreich angewendet. Die Einführung verschiedener Mutationen der Spacer-Region führte dabei zu den für den RMCE essentiellen heterospezifischen *FRT*-Erkennungsstellen, die nur mit sich selbst, nicht aber mit der Wildtyp-*FRT*-Erkennungsstelle oder anderen mutierten *FRT*-Sequenzen wechselwirken können (McLeod *et al.*, 1986; Schlake und Bode, 1994; Senecoff und Cox, 1986; Umlauf und Cox, 1988).

Das RMCE-System ermöglicht also den ortsspezifischen Austausch einer Reporter- oder Selektionsmarker-Expressionskassette gegen beliebige Ziel-DNA-Sequenzen an einem definierten Gen-Ort (Abbildung 1-5). Dazu wird zunächst die Ausgangszelllinie auf dem konventionellen Weg generiert: Ein Selektionskonstrukt wird zufällig ins Genom integriert, welches ein Reporter- oder Selektionsmarkergen trägt, das von heterospezifischen *FRT*-Erkennungsstellen flankiert ist. Auf den Selektions- und Auswahlprozess kann dann eine Co-Transfektion des Flp-Rekombinase-kodierenden Vektors und des so genannten Austauschkonstruktes erfolgen, welches das GOI mit entsprechenden flankierenden *FRT*-Erkennungsstellen, trägt. Nach dem RMCE liegt dann das GOI genomisch an der Position vor, an der zuvor das Selektionskonstrukt integriert war.

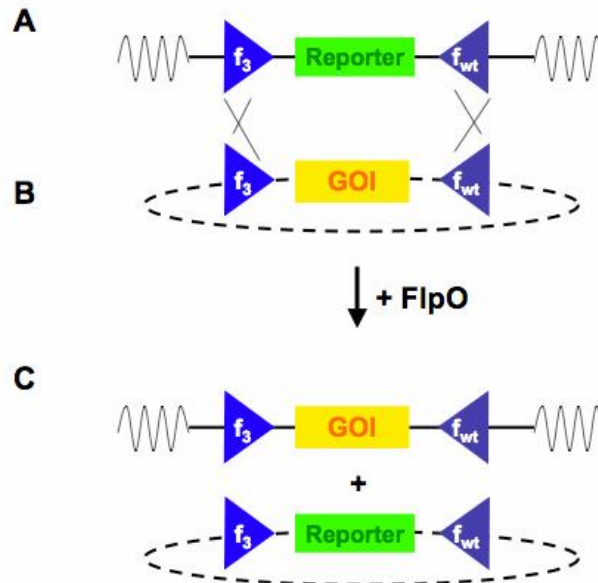


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausches (RMCE). Das Selektionskonstrukt (ein Reportergen bzw. Selektionsmarker, flankiert von den heterospezifischen *FRT*-Erkennungsstellen f_3 und f_{wt}) ist genomisch etabliert (A). Für den RMCE wird das Austauschkonstrukt (GOI, flankiert von den dem Selektionskonstrukt entsprechenden *FRT*-Erkennungsstellen f_3 und f_{wt}) und ein Flp-Rekombinase-codierender Vektor co-transfiziert (B). Die *FRT*-Erkennungsstellen sind heterospezifisch, d.h. sie interagieren nur mit ihrem identischen Partner. Nach RMCE liegt das GOI im Austausch gegen den Reporter genomisch vor (C).

1.6 Antikörper als Zielproteine biopharmazeutischer Produktion

In Diagnostik und Forschung spielen monoklonale Antikörper eine große Rolle, da sie unterschiedliche Moleküle, ihre Antigene, mit hoher Spezifität binden können. Diese Bindung kann mit zahlreichen Techniken nachgewiesen werden und bildet die Grundlage für diverse diagnostische Verfahren. Beispiele dafür sind Immunoblotting und Immunopräzipitation (Bonifacino *et al.*, 2001; Gallagher *et al.*, 2008), ELISA (Hornbeck *et al.*, 2001), ELISPOT (Hornbeck *et al.*, 2001), FACScan (Givan, 2001) und Immunohistochemie. Antikörper werden auch zur Aufreinigung verwendet, wobei Proben über Säulenmaterialien mit immobilisierten Antikörpern gereinigt werden können. Ebenfalls möglich ist die Anreicherung bzw. Fraktionierung von Zellpopulationen unter Verwendung von Antikörpern mittels FACSORT (Givan, 2001) oder MACS[®], einem System zur magnetischen Zellsortierung (Miltenyi *et al.*,

1990), worauf in 1.7.1 näher eingegangen wird. Auch die *in vivo* Diagnostik basiert häufig auf Antikörpern.

Im pharmazeutischen Sektor nimmt die Expression rekombinanter Antikörper durch den vielfältigen Einsatz einen ganz bedeutenden Stellenwert ein. Oft werden für die Therapie beispielsweise neutralisierende oder aktivierende Antikörper eingesetzt, oder in der Zellkultur zur Aktivierung spezieller Zelltypen für die therapeutische Anwendung genutzt. Auch *in-vivo*-Depletionen bestimmter Zelltypen sind unter Einsatz von Antikörpern machbar. Eine weitere gängige Applikation von Antikörpern ist die passive Antikörpertherapie bei infektiösen Erkrankungen.

Bei Antikörpern handelt es sich um Proteine, deren Glykosylierung (Mattu *et al.*, 1998) einen starken Einfluss auf ihre primäre funktionelle Aktivität, Stabilität und vor allem die Immunogenizität im Organismus hat (Walsh, 2006). Das Produktionssystem muss daher so gewählt werden, dass die Glykosylierungsmuster der rekombinanten Antikörper dem humanen System so weit wie möglich entsprechen.

Antikörper erfüllen mehrere Aufgaben des Immunsystems und kommen als wasserlösliche Substanzen in Blut und anderen Körperflüssigkeiten, oder in ihrer membrangebundenen Form als Teil des B-Zell Rezeptors (BCR="B cell receptor") vor. Beim BCR ist das Carboxylende eine hydrophobe, in der Membran verankerte Sequenz, beim humoralen Antikörper dagegen eine hydrophile Sequenz, die seine Sekretion erst ermöglicht.

Antikörper, die auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden, bestehen in ihrer Grundstruktur aus vier Polypeptidketten: Den zwei identischen schweren Ketten mit annähernd 50 kDa (Hc="heavy chain") und den zwei identischen leichten Ketten mit 25 kDa (Lc="light chain"). Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden und jede schwere Kette ist ebenfalls durch eine Disulfidbrücke mit einer leichten Kette verknüpft (Woof und Burton, 2004). Die schweren Ketten sind mit den kleinen griechischen Buchstaben μ , δ , γ , α und ϵ bezeichnet (Janeway *et al.*, 2002) und entsprechend werden die Antikörperklassen benannt: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE (Rhoades und Pflanzner, 2002). Antikörper der Klasse IgG (Abbildung 1-6) sind dabei am häufigsten vertreten.

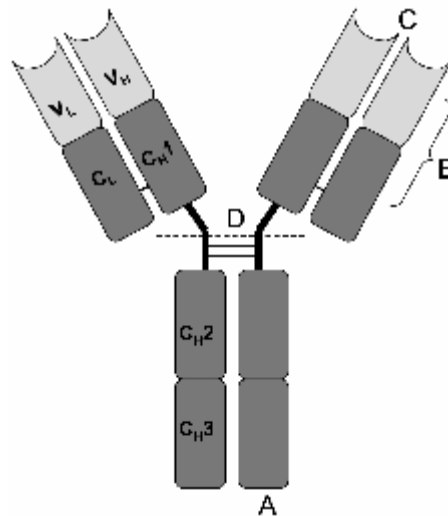


Abbildung 1-6: Vereinfachte schematische Darstellung eines IgG. A=Schwere Antikörperkette; B=leichte Antikörperkette; C=Antigenbindungsstelle, Paratop; D=Spaltungsstelle für Papain, welches den Antikörper in die Fab-Teile („Fragment antigen-binding“; V_H und C_{H1}.) und den Fc-Teil („Fragment cristallizable“, durch die Disulfidbrücken verbundene C_{H2}- und C_{H3}-Domänen beider schweren Ketten) spaltet. Der Bereich zwischen CH1 und C_{H2} wird als „hinge“-Region (=Gelenk-Region) bezeichnet. V_L, V_H=variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette; C_L, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}=konstante Regionen der leichten bzw. schweren Kette. Die beiden schweren Ketten werden durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden, die leichten Ketten jeweils über eine Disulfidbrücke an der schweren Kette fixiert (in Anlehnung an Janeway *et al.*, 2002).

In Antikörpern kommen zwei Typen von leichten Ketten vor, die man als Lambda-(λ)- und Kappa-(κ)-Ketten bezeichnet. Ein Immunglobulin hat entweder nur den einen oder den anderen Typ, nie beide Typen gleichzeitig. Zwischen Antikörpern mit λ- und κ-Ketten ließen sich bisher keine funktionellen Unterschiede nachweisen und beide Typen von leichten Ketten können in jeder der fünf Hauptklassen von Antikörpern vorhanden sein (Janeway *et al.*, 2002).

Die schweren und leichten Ketten der Immunglobuline setzen sich aus konstanten und variablen Regionen zusammen (Abbildung 1-6). Die aminoterminalen V-Regionen der schweren und leichten Ketten (V_H bzw. V_L) bilden zusammen die variable Region des Antikörpers und verleihen ihm die Fähigkeit, ein spezifisches Antigen zu binden. Die C-Regionen der schweren und leichten Ketten (C_H bzw. C_L) dagegen bilden die konstante Region. Die konstanten Regionen der schweren Ketten α, γ und δ bestehen aus drei, die der Ketten μ und ε aus vier Domänen (Janeway *et al.*, 2002). Die „hinge“-Region (=Gelenk-Region) vermittelt erhöhte Flexibilität des Moleküls (Woof und Burton, 2004).

Mit Hilfe des proteolytischen Enzyms Papain wurde die Struktur von Antikörpermolekülen untersucht und festgestellt, welche Teile des Moleküls für die verschiedenen Funktionen

verantwortlich sind. Papain spaltet Immunglobuline in drei Fragmente, wovon zwei, die Fab-Fragmente („fragment antigen binding“), identisch sind und mit ihrer antigenbindenden Aktivität den beiden „Armen“ des Moleküls entsprechen. Sie bestehen aus einer konstanten und einer variablen Domäne jeder leichten und schweren Kette des Antikörpers. Die variablen Domänen der schweren und leichten Kette beinhalten jeweils drei variable Schleifen, die CDRs („Complementarity Determining Region“), die für die Antikörperbindung verantwortlich sind. Das andere Fragment wird als Fc-Fragment („fragment cristallizable“) bezeichnet und besitzt keine antigenbindende Aktivität. Es übernimmt vielmehr die Funktion der Modulation von Immunzellen und stellt sicher, dass der Antikörper eine dem Antigen entsprechende Immunreaktion vermittelt (Heyman, 1996; Huber, 1980). Die Glykosylierung des Fc-Fragmentes ist dabei essentiell für die Fc-Rezeptor vermittelte Aktivität (Borghesi und Milcarek, 2006).

1.7 Selektion hoch-produzierender Zellklone

Im Focus der biopharmazeutischen Produktion steht neben der Herstellung eines aktiven Proteins die Identifikation eines stabilen, hoch-produzierenden Transfektantenklons einer geeigneten Zelllinie. Einen solchen Klon während der Zelllinienentwicklung zu identifizieren, ist äußerst zeit- und arbeitsaufwendig. Da bekannt ist, dass es nur bei einem von 10.000 Transfektionseignissen zu einer stabilen genomischen Integration kommt, ist allein die Ausbeute erfolgreich transfizierter Zellen niedrig (Kim *et al.*, 1998a). Durch Selektion oder Sortierung können die nicht-transfizierten Zellen aus der Kultur eliminiert werden (Kaufman *et al.*, 2008). Die verbleibenden transfizierten Zellen weisen jedoch höchst unterschiedliche Expressionsniveaus des GOI auf. Entsprechend einer Normalverteilung (Abbildung 1-7) finden sich die meisten Zellen mit niedriger bis mittlerer Expression und nur ein sehr geringer Anteil mit hoch-exprimierenden Eigenschaften. Interessant sind aber nur die Klone, die besonders gut exprimieren. Es ist davon auszugehen, dass mehrere zehntausend Klone analysiert werden müssen, um einen Hoch-Produzenten zu identifizieren (Jones, 2007). Die Wahrscheinlichkeit der Identifikation eines besonders geeigneten Produzenten steigt also mit der Anzahl der analysierten Klone an.



Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Normalverteilung der spezifischen Produktionsrate in heterogenen Zellpopulationen.

Problematisch ist, dass die Analyse einzelner Klone auf ihre spezifische Produktivität mit einem äußerst hohen Arbeitsaufwand verbunden ist und damit auch eine zeitliche Limitation birgt. Um den Aufwand zur Identifikation eines hoch-produzierenden Klon zu minimieren, wurden unterschiedliche Systeme entwickelt. Besonders praktikabel ist dabei die Möglichkeit der selektiven Isolation solcher Produzenten. Daraus ergibt sich eine Reduktion der zu analysierenden Population und damit einhergehend die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Identifikation eines sehr guten Produzenten. Besonders häufig finden Durchflusszytometrie und FACS-Sortierung Anwendung, womit auch sehr seltene Zellen isoliert werden können (Bonner *et al.*, 1972; Mattanovich und Borth, 2006). Die Detektion der Produzentenzellen kann für einige Systeme über die Oberflächen-Expression des Antikörpers erfolgen, da z.B. einige Hybridome eine Korrelation der Oberflächen-Assoziation und der Menge des sezernierten Proteins aufweisen (Marder *et al.*, 1990; Sen *et al.*, 1990)

Für den Fall, dass Oberflächen-Assoziation und Produktivität nicht korrelieren, macht man sich häufig fluoreszente Reportergene, wie z.B. das grün fluoreszierende Protein (GFP) zu Nutze, die in der rekombinanten Zelllinie mit dem GOI co-exprimiert werden. Dies erfolgt entweder als Fusionsprotein oder in bicistronischen Systemen unter Verwendung von IRES-("internal ribosomal entry sites") Elementen (Mancia *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2000; Mosser *et al.*, 1997). Die Produzentenzellen können mittels FACSTM identifiziert und isoliert werden (Meng *et al.*, 2000; Sleiman *et al.*, 2008). Für den Fall, dass Antikörper produziert werden, bietet sich besonders an, jede Antikörperkette mit einem eigenen Fluoreszenzprotein zu co-exprimieren. Die Sortierung erfolgt dann nur auf dual-fluoreszente Zellen und stellt so die Produktion des Multimers sicher. Eine weitere Möglichkeit ist die Co-

Expression von Oberflächenmarkern, die in der Natur nicht auf der Zelllinie vorkommen. Für CHO-Zellen sind beispielsweise CD20 (DeMaria *et al.*, 2007), CD4, LNGFR oder H2K^K (Miltenyi Biotec GmbH) zu nennen. Diese werden in bicistronischen Systemen exprimiert. Möglich ist hierbei ebenfalls eine Sortierung der Produzentenzellen, entweder durch FACS (DeMaria *et al.*, 2007) oder, da es sich um Oberflächenmarker handelt, mittels magnetischer Separation (MACSelect™, Miltenyi Biotec GmbH). Bei Verwendung des IRES-Elements besteht hierbei das Problem, dass die Expression von GOI und Reportergen nicht gleich reguliert ist (Mizuguchi *et al.*, 2000). Der Reporter kann daher nur als relatives Maß für die Produktivität betrachtet werden. Diese Methoden sind daher eher für die quantitative Positivselektion stabiler Transfektanten geeignet als für die qualitative Isolation von Hoch-Produzenten. Für den Fall, dass die nachzuweisenden Proteine von den Produzentenzellen dissoziieren, kann eine Immobilisierung des sezernierten Antikörpers in direkter Umgebung der Produzentenzelle mittels der „Gel Microdrop Technologie“ erreicht werden (Akselband *et al.*, 2003). Dabei werden Zell-Emulsionen hergestellt, bei denen sich die Zellen in Tröpfchen geschmolzener, biotinylierter Agarose befinden. Darauf wird dann über Avidin ein spezifischer „Fangantikörper“ fixiert, der das sezernierte Protein bindet, welches über einen Fluoreszenz-markierten Detektions-Antikörper nachgewiesen werden kann. Eine weitere Möglichkeit bieten Matrix-basierte Sekretions-Assays. Die Zelloberfläche wird mit einer künstlichen Matrix versehen, über die eine Immobilisierung der Proteine erfolgen kann.

Einige Methoden arbeiten zusätzlich über eine Kultivierung der Zellen in einem Methylzellulose-haltigen, semi-soliden Medium. So wird die Diffusion des Produktes im Medium verlangsamt. Die Zellen werden mit Biotin beladen und dann mit einem Antikörper-Avidin-Konjugat oder einer Avidin-Brücke und einem biotinylierten Antikörper versehen, der das darzustellende Protein bindet. Es kann dann mittels eines Fluoreszenzantikörpers detektiert und sortiert werden (Hanania *et al.*, 2005; Holmes und Al-Rubeai, 1999; Manz *et al.*, 1995).

Neben diesen FACS-basierten Analysen gibt es auch den Ansatz, die zu analysierende Kultur in einem semi-soliden Kulturmedium zu vereinzeln und bis zur Koloniebildung zu kultivieren. Das sezernierte Produkt wird wiederum in unmittelbarer Nähe der Kolonie immobilisiert und kann durch fluoreszente Antikörper detektiert werden (Lee *et al.*, 2006). Die Identifikation und Isolation der Hoch-Produzenten erfolgt dann entweder mikroskopisch und manuell oder automatisiert (Caron *et al.*, 2009). Automatisierte Systeme wie etwa der ClonePix von Genetix (<http://www.genetix.com>) ermöglichen dabei die Isolation von Kolonien nach bereits wenigen Tagen.

1.7.1 Das MACS[®]-System: Separation von Zielzellen aus heterogenen Populationen

Die Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) besitzt ein System, mit dessen Hilfe unterschiedliche Zielzellen aus Mischkulturen isoliert werden können. Das MACS[®]-System dient der Separation von Zielzellen aus heterogenen Zellpopulationen, meist aus Blut, mittels spezifischer Oberflächenmarker (Abbildung 1-8). Dabei binden Antikörper, die an magnetische Partikel gekoppelt sind (Antikörper-Microbead-Konjugat), spezifisch an die Antigene auf der Zelloberfläche der Zielzelle. Die so magnetisierten Zellen können im Magnetfeld zunächst zurückgehalten und anschließend gezielt eluiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das MACS[®]-System zusätzlich zur Anreicherung von hochproduzierenden Hybridom-Klonen effizient genutzt werden kann (Hoch, 2005). Dabei macht man sich zu Nutze, dass bei Hybridomen die Menge der sezernierten Antikörper mit der Menge Oberflächen-assoziierten IgG korreliert und darüber eine Separation möglich ist (Sen *et al.*, 1990; Thammana und Scharff, 1983).

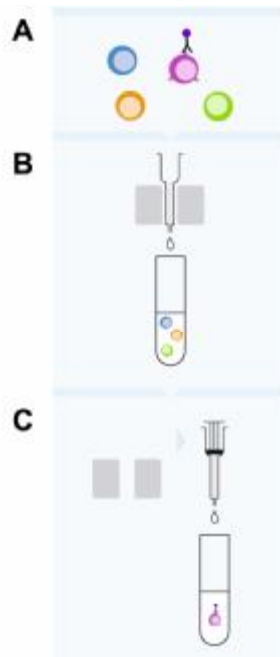


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der Positivanreicherung mittels MACS®-Separation. Die Zielzellen eines Zellgemisches werden mit Antikörper-Microbead-Konjugaten spezifisch markiert (A) und auf eine in einem Magnetfeld positionierte MACS®-Säule gebracht (B). Dabei werden die magnetisierten Zellen an den magnetischen Partikeln der Säule zurückgehalten, nicht markierte Zellen werden durch Waschen entfernt. Die Elution der Positivfraktion erfolgt durch Entnahme der Säule aus dem Dauermagneten (C).

Die Methode kann jedoch nicht auf Zellen übertragen werden, die keine Membran-assoziierten Antikörper-Moleküle besitzen, weshalb die Isolation anderer rekombinanter Hoch-Produzenten-Zelllinien auf alternativem Wege stattfinden muss. Eine für diesen Fall erfolgreiche publizierte Anreicherung wurde von Brezinsky *et al.* (2003) vorgenommen. Hierzu wurden die sezernierten Zielproteine mit einem spezifischen, fluoreszenz-markierten Antikörper detektiert. Die Inkubation fand bei niedrigen Temperaturen statt, wodurch die Sekretion des Proteins so sehr verlangsamt wurde, dass eine Sortierung der fluoreszenten Produzenten Zellen im FACS möglich war.

Der „Cytokine Secretion Assay“ (Miltenyi Biotec GmbH) hat einen ähnlichen Aufbau wie die von Holmes und Al-Rubeai beschriebenen Matrix-basierten Systeme (1999). Hier wird die Biotinylierung der Zelloberfläche jedoch vermieden, indem die Zelle mit einem bispezifischen Antikörper-Konjugat, der so genannten Fangmatrix, markiert wird (Abbildung 1-9). Der eine Teil der Fangmatrix bindet spezifisch an die Zelloberfläche, der andere Teil besitzt eine Spezifität für das sezernierte Cytokin, welches dann über einen weiteren fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden wird. Die Anreicherung der Cytokinproduzenten

unter Verwendung eines anti-Fluoreszenz-Microbead-Konjugates mittels MACS®-Technologie ist somit möglich.

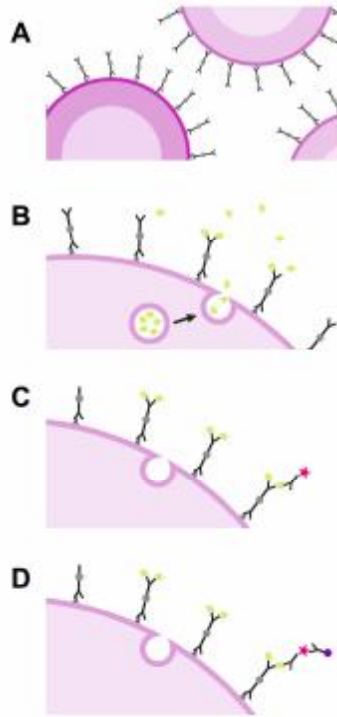


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des MACS® Cytokine Secretion Assay. Alle Zellen werden mit einem bispezifischen Antikörper-Konjugat inkubiert, das einerseits spezifisch an eine Oberflächenstruktur der Zelloberfläche bindet und andererseits eine Spezifität für das nachzuweisende Cytokin besitzt (A). Im nächsten Schritt erfolgt eine Sekretionsphase, in der das sezernierte Cytokin an das Antikörper-Konjugat auf der Zelle bindet (B) und über einen Fluoreszenz-markierten Antikörper mit entsprechender Spezifität detektiert werden kann (C). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Produzentenzellen über ein anti-Fluoreszenz-Antikörper-Microbead-Konjugat anzureichern (D).

2 Ergebnisse

2.1 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluierung der Anwendbarkeit von RMCE (Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch) zur Entwicklung eines Expressionssystems rekombinanter Antikörper in mammalischen Zellen. Dabei beruht die Auswahl einer geeigneten Wirtszelllinie und eines effektiven Expressionssystems zur biopharmazeutischen Proteinproduktion auf vielen Faktoren. Essentiell für eine ökonomische Eignung sind Eigenschaften wie Höhe der Expressionsniveaus, Proliferation und erreichte Zelldichten in der Kultur. Die Eignung des Produktes für therapeutische Anwendungen ergibt sich durch Empfänger-kompatible post-translationale Modifikationen, korrekte Proteinfaltung, biologische Funktionalität sowie regulatorische und ökonomische Anforderungen. Säugerzellen haben gegenüber anderen Systemen viele Vorteile, erfüllen sie doch unter Anderem in Hinblick auf Proteinfaltung und post-translationale Modifikationen, wie beispielsweise Glykosylierung, die nötigen Voraussetzungen, um biologisch wirksame und verträgliche rekombinante Proteine zu generieren. Besonders CHO-Zellen sind sehr gut charakterisierte Säugerzellen. Sie werden heute nicht zuletzt wegen ihrer hohen virologischen Sicherheit gegenüber Humanpathogenen für die Produktion der meisten kommerziellen und klinischen Antikörper verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll ein Expressionssystem etabliert werden, das den hohen regulatorischen und ökonomischen Anforderungen industrieller Antikörperproduktion gerecht wird. Dazu wird ein Gen-Kopienzahl-unabhängiger Ansatz bevorzugt, der das Risiko der Instabilität der Zelllinie reduzieren soll. Da mit dieser einzelnen Genkopie jedoch eine hohe spezifische Produktionsrate von mindestens 10 pcd erreicht werden soll, muss auf einen transkriptionell hochaktiven Gen-Ort selektioniert werden. Dazu wird ein Selektionssystem etabliert, welches dem Zielprotein möglichst stark ähnelt, d.h. eine modifizierte schwere Antikörperkette. Dies soll eine hohe Korrelation der im Selektionsprozess gewonnenen Daten mit den tatsächlichen Produktionseigenschaften der Zellen gewährleisten. Da eine geeignete genomische Positionierung des Selektionsmarkers ein zufälliger Prozess und damit nicht zu beeinflussen ist, wurde entschieden, die Eignung des Gen-Orts durch S/MAR-Sequenzen zu optimieren, die die gesamte Transgen-Kassette flankieren.

Die Basiszelllinie sollte unter Verwendung des RMCE etabliert werden. Der Vorteil ist, dass sie dadurch zur Produktion jedes beliebigen rekombinanten Antikörpers und auch anderer rekombinanter Proteine genutzt werden kann. Eine solche Basiszelllinie reduziert den enormen Selektionsaufwand und die kosten- und zeitaufwändigen Qualitätstestungen, verbessert die Planbarkeit der Generierung weiterer spezifischer Produktionszelllinien und bietet eine hohe Prozess- und Produktkontinuität.

2.2 Generierung einer RMCE-kompatiblen Basiszelllinie

2.2.1 Identifikation einer geeigneten Zelllinie (serumfreie versus serumhaltiger Handhabung)

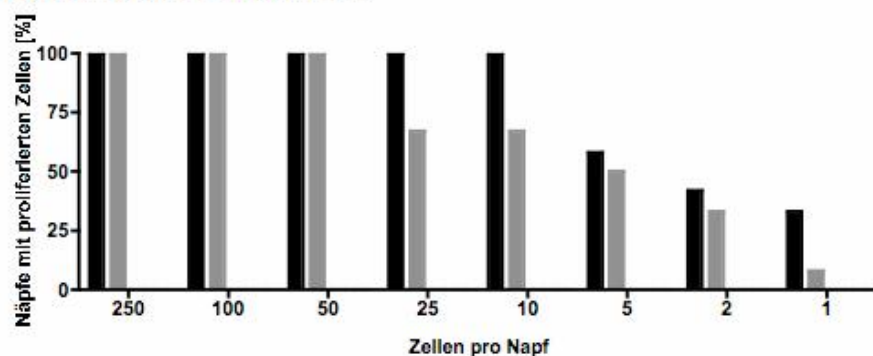
Therapeutische Antikörperproduktion in der Industrie wird ausschließlich unter Verwendung von Zelllinien durchgeführt, die unter serumfreien Bedingungen in Suspension kultiviert werden. Diese Zelllinien werden dazu im großindustriellen Maßstab generiert und kultiviert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Machbarkeit des gewählten Expressionssystems gezeigt werden. Um eine robuste Ausgangszelllinie zu identifizieren, wurde im ersten Ansatz eine serumfreie mit einer serumabhängigen CHO-Zelllinie verglichen. Bei der Entscheidung zugunsten einer serumabhängigen Zelllinie ist zu berücksichtigen, dass eine serumfreie Adaption der entstandenen Basiszelllinie dann im nächsten Schritt erforderlich ist. Dies ist aber nur ökonomisch, wenn eine akzeptable spezifische Produktivität in der Kultur erreicht wurde.

2.2.2 FACS-Sortierung zur Einzelzellklonierung

Ein Schwerpunkt für die Auswahl der Zelllinie lag aufgrund der Projektstrategie in der guten Subklonierbarkeit der Zellen. Analysiert wurde daher zunächst die Sortierbarkeit von CHO-Zellen im FACSVantage SE (Becton Dickinson). Diese Methode ermöglichte die Aussaat von Einzelzellen in 96-Napf-Zellkulturplatten und bedeutete damit neben der Gewährleistung der Generierung von reinen Subklonen eine deutliche Verringerung des Selektionsaufwandes.

Es wurden untransfizierte und *egfp*-transfizierte CHO-DG44-Zellen sortiert. Bei einer der Ausgangskulturen handelte es sich um serumunabhängige Suspensionszellen, die von der Firma Invitrogen bezogen wurden. Die zweite Ausgangskultur stellten serumabhängige adhärenzte CHO-DG44-Zellen dar (Urlaub und Chasin, 1980a), die freundlicherweise von Dr. Lawrence Chasin, Columbia University (New York, NY) zur Verfügung gestellt wurden.

A: Kulturmedium + 10 % FCS



B: Kulturmedium + 50 % konditioniertes Medium + 10 % FCS

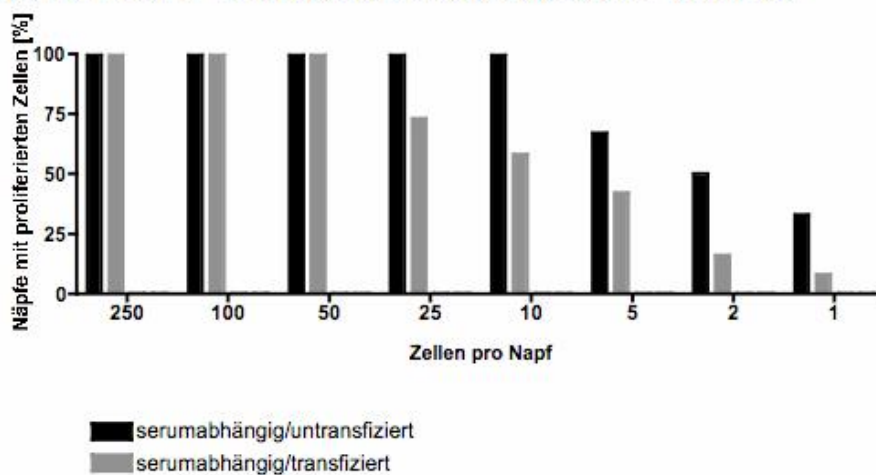


Abbildung 2-1: Analyse der Anwachsrate durch FACS-Sortierung einzelner Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen. Dargestellt sind die Anwachsrate serumunabhängiger und serumabhängiger CHO-DG44-Zelllinien (stabil transfiziert und untransfiziert) nach Vereinzelung durch FACS-Sortierung und Aussaat verschiedener Zelldichten in Medium mit FCS (A) und Medium mit FCS und konditioniertem Medium (B). Die Zellkulturplatten wurden nach 14 Tagen Kulturdauer bei 37 °C und 9 % CO₂ mikroskopisch auf erfolgreiche Proliferation untersucht. Nur die serumabhängigen Zellen überlebten die Sortierung.

Die Abbildung 2-1 zeigt eindeutig, dass die ursprünglich serumunabhängigen CHO-DG44-Zellen auch in Kulturmedium mit 50 % konditioniertem Medium und mit 10 % supplementiertem FCS nicht durchflusszytometrisch sortierbar waren. Bei unterschiedlichen Aussaatdichten proliferierten weder untransfizierte noch transfizierte Zellen in Kultur mit FCS oder mit FCS und konditioniertem Medium. Eine Vitalitätsbestimmung der Zellen durch Färbung mit Erythrosin B und anschließender mikroskopischer Bewertung ergab, dass nach der Sortierung nur noch 6 % der Zellen im Vergleich zur Ausgangsvitalität lebten, vier Stunden später waren keine vitalen Zellen mehr in der Zellsuspension vorhanden. Dies zeigte, dass die Zellen durch den Sortierungsprozess starben.

Die serumabhängigen CHO-DG44-Zellen hingegen überlebten den FACS-Sortierungsprozess unabhängig von Kulturmedium, Aussaatdichte oder EGFP-Expression. Da die serumunabhängigen CHO-DG44-Zellen aber einen großen Vorteil für die Produktion von rekombinanten Proteinen aufweisen, wurde zunächst getestet, ob die Zellen per Endpunktverdünnung subklonierbar waren.

2.2.3 Endpunktverdünnung zur Einzelzellklonierung

In 2.2.2 konnte gezeigt werden, dass serumunabhängigen CHO-DG44-Zellen im Vergleich zu den serumabhängigen CHO-DG44-Zellen die Sortierung im FACS nicht überlebten. Daher wurde die Subklonierung per Endpunktverdünnung als alternative Methode getestet und die Subklonierungseffizienzen der serumunabhängigen CHO-Zelllinien K1 und DG44 verglichen.

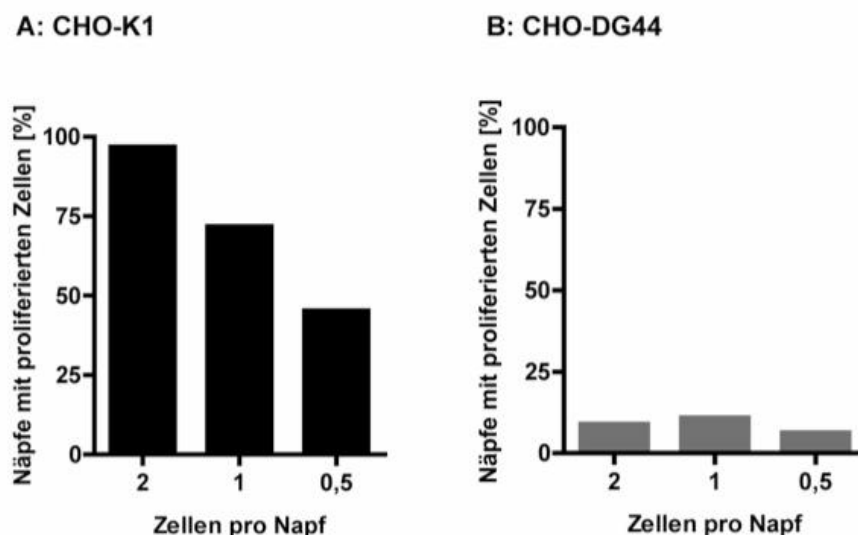


Abbildung 2-2: Analyse der Subklonierungseffizienz verschiedener CHO-Zelllinien in serumfreien Kulturmedien mit unterschiedlichen Aussaatdichten. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil proliferierter Subklone nach 14 Tagen Kulturdauer bei 37 °C und 9 % CO₂. Die serumfreien CHO-Zelllinien K1 (A) und DG44 (B) wurden mit verschiedenen Zelldichten (2; 1; 0,5 Zellen pro Napf in 100 µL) in 96-Napf-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 14 Tagen wurden die Zellkulturplatten makroskopisch und mikroskopisch bewertet, um Näpfe mit proliferierten Zellen zu identifizieren.

Es wurde offensichtlich, dass CHO-K1-Zellen eine sehr hohe Subklonierungseffizienz besaßen. Sogar bei einer theoretischen Aussaatdichte von 0,5 Zellen pro Napf, was einer realen Aussaat von einer Zelle in jedem zweiten Napf entsprach, kam es zu knapp 50 % proliferierenden Klonen in den 96-Napf-Zellkulturplatten, also zu einem Anwachsen von beinahe allen ausgesäten Näpfen.

Die CHO-DG44-Zellen ließen sich deutlich schlechter subklonieren. Es wurde außerdem kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Aussaatdichten deutlich. Die ebenfalls analysierten, serumunabhängigen Dukx-B11-Zellen (dhfr⁻/dhfr⁺) zeigten in keinem der ausgesäten Näpfe proliferierende Zellen (nicht dargestellt).

2.2.4 Herstellung stabiler Transfektantenklone und genetische Analyse

Das Ziel der Experimente war die Entwicklung einer RMCE-kompatiblen Basiszelllinie, die mit einer einzelnen Gen-Kopie an einem hochaktiven Gen-Ort hohe spezifische Produktivitäten erreicht. Keiner der durchgeführten Vorversuche nach etablierten

Elektroporations-Protokollen mit verschiedenen Vektormengen und Elektroporations-Parametern (Baer *et al.*, 2000) und deren Modifikationen brachte jedoch Einzelkopie-Klone hervor (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Ursache dafür könnte die Verwendung der oben bereits beschriebenen serumfrei-kultivierten CHO-DG44-Zelllinie gewesen sein und entweder mit einer hohen Empfindlichkeit der Zellen zusammengehangen haben oder aber damit, dass die Zellen eine sehr schlechte Subklonierungseffizienz aufwiesen. Die auf ihre Gen-Kopienzahl hin analysierten Kulturen könnten, trotz mehrfacher Subklonierungen, Mischkulturen gewesen sein, und somit im Southern Blot ein unkorrektes Bandenmuster ergeben haben. Das hätte zur Folge, dass die genomische Analyse auf mehrere Gen-Kopien hindeutete, aber eigentlich durch mehrere Klone mit Einzelkopien in einer Probe hervorgerufen wurde.

Demzufolge wurden die weitaus robusteren, serumabhängigen CHO-DG44-Zellen ausgewählt, um das angestrebte Expressions-System zu etablieren.

2.3 Generierung einer Expressions- und Austausch-kassette

2.3.1 Design des Selektionskonstruktes: Aufbau und Selektionsstrategie

Für die Etablierung eines Expressions-Systems für rekombinante Proteine ist es von großem Vorteil, einen Zellklon zu identifizieren, der neben einer hocheffizienten Proteinbiosynthese eine ebenfalls effiziente und quantitative Sekretion des exprimierten Proteins gewährleistet. Das etablierte Selektionssystem sollte daher optimalerweise eine Analyse beider Parameter – also der intrazellulär messbaren Expression ebenso wie der Sekretion des Zielproteins ins Medium – ermöglichen (Brezinsky *et al.*, 2003). Diese zweistufige Selektion bot damit einen immensen Vorteil gegenüber gängigen einstufigen Reportersystemen: Die Identifikation eines Klons mit einem sehr hohen intrazellulären Reporter- oder Zielprotein-Niveau bedeutet nicht zwangsläufig, dass dieser Klon das intrazellulär detektierbare Protein auch quantitativ sezernieren kann. Genau diese Eigenschaft ist allerdings für einen Klon zur effektiven rekombinanten Proteinexpression unverzichtbar.

Als Grundlage dieser Arbeit diente daher ein Selektionskonstrukt (Abbildung 2-3), welches aus verschiedenen Komponenten bestand und die zweiphasige Analyse der Transfektantenklone ermöglichen sollte. In zentraler Position befand sich ein Fusionsgen, das aus einem Reportergen (*egfp*) und dem Genabschnitt, der für die konstante Region der

schweren murinen IgG1-Kette (*mhc*) kodiert, bestand. Das daraus resultierende Fusionsprotein wurde durch die Leader-Sequenz der schweren Kette eines humanen IgGs sezerniert. Dies ermöglichte eine intrazelluläre Bestimmung des EGFP-Niveaus mittels Durchflusszytometrie und eine Quantifizierung des sezernierten Produktes im Zellkulturüberstand mittels ELISA über den konstanten mIgG1-Teil.

Das zentrale Fusionsgen der Expressionskassette sollte im Rahmen der Experimente zunächst zur Identifikation interessanter Transfektantenklone genutzt werden, um dann in einem nächsten Schritt flexibel durch weitere Gene ersetzt werden zu können. Der Aufbau ist in Abbildung 2-3 dargestellt. Dazu wurden flankierend zum *egfp-mhc* zwei *FRT*-Erkennungssequenzen (f_3 und f_{wt}) angeordnet, wobei die am 3'-Ende positionierte f_{wt} invers zu der am 5'-Ende liegenden f_3 orientiert war. Damit sollte die gesamte Expressionskassette durch RMCE austauschbar sein. Eine Aktivität der Flp-Rekombinase bezüglich einer enzymvermittelten Exzision ist aufgrund der Heterospezifität der *FRT*-Erkennungssequenzen nicht zu erwarten (Schlake und Bode, 1994). Die inverse Orientierung der *FRT*-Sequenzen wurde hier zur zusätzlichen Sicherheit aufgegriffen. Durch diese Anordnung käme es im Falle von einer Reaktion der beiden heterospezifischen *FRT*-Sequenzen höchstens zu einer Inversion der austauschbaren Kassette, die in diesem Falle keine Konsequenzen für die Expression des Selektionsproteins haben würde. Flankierend wurden außerdem zwei S/MAR-Sequenzen angeordnet. Am 5'-Ende des Konstruktes wurde die 2,2 kb große S/MAR-E aus dem 5'-Bereich des humanen Interferon-Gens positioniert (Bode und Maass, 1988), die *in vitro* unter Standardbedingungen zu 96 % an Kernmatrixpräparationen bindet (Fragment I in Mielke et al., 1990) und *in vivo* zur Steigerung der Expression benachbarter Reportergene führt (Klehr et al., 1991; Mielke et al., 1990). Am 3'-Ende des Konstruktes wurde die 1,3 kb große S/MAR-W aus dem ersten Intron eines lichtinduzierbaren Gens aus der Kartoffel angeordnet. Diese wirkt Spezies-unabhängig, hat der S/MAR-E vergleichbare Matrix-Bindungseigenschaften und steigert ebenfalls die Genexpression in Säuger-Kulturzellen (Fragment X in Mielke et al., 1990). Diese Sequenzen sollten folgenden Zweck erfüllen: Eine qualitative und quantitative Stabilisierung der Genexpression, Schutz gegen Expressionsminderung, Dekondensation des Chromatins, sowie Rekrutierung von Proteinen der Proteinbiosynthese und daraus resultierend höhere Expressionsniveaus. Außerdem wurde erwartet, dass durch das Element S/MAR-W der mögliche negative Einfluss des Gens *neo^R* auf die Genexpression durch „Silencing“ (Artelt et al., 1991) gemildert wird und es eine Abschirmung der mit dem Konstrukt eingeführten prokaryotischen Sequenzen verhindert.

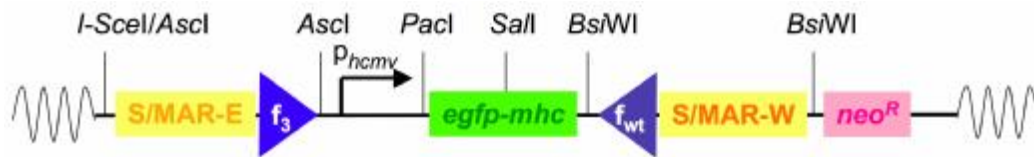


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des Selektionskonstruktes. *I-SceI*, *Ascl*, *PacI*, *SalI*, *BsiWI*=Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen; S/MAR-E und S/MAR-W=Scaffold/Matrix-Attachment-Regions; *f₃*, *f_{wt}*=*FRT*-Erkennungsstellen („flippase-recognition-target“) der Flp-Rekombinase; *p_{hcmv}*=humaner Zytomegalievirus-Promotor („Human cytomegalovirus IE1 promoter“); *egfp-mhc*=Fusionsgen aus *egfp* („enhanced green fluorescent protein“) und *mhc* (konstante Region einer schweren Maus-IgG1-Antikörperkette); *neo^R*=Neomycin-Resistenzgen und restliche pSV2-neo-Vektorsequenzen.

Da der gesamte Vektor in linearisierter Form zur Transfektion verwendet wurde, enthielten die Transfektanten nach genomischer Etablierung zusätzlich die Vektorsequenzen und das Neomycin-Resistenzgen des Vektors pSV2-neo. Dies ermöglichte die Selektion mit Geneticin (G418) zur Generierung von stabilen Klonen.

2.3.2 Klonierung des Selektionskonstruktes

Das Selektionskonstrukt wurde in mehreren Schritten basierend auf pSV2-neo-hcmv-mHc kloniert. Dieses Konstrukt wurde bereits intern für die Expression eines rekombinanten Maus-IgG1-Antikörpers generiert (Busch, 2005b). Zunächst wurde das synthetisch hergestellte *egfp* inklusive der humanen Leader-Sequenz (Geneart) über die Schnittstellen *PacI* und *SalI* in Analogie zu einer variablen Region vor dem *mhc*-Genabschnitt eingesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die ungerichtete Klonierung der ebenfalls synthetisch hergestellten Fragmente S/MAR-E- f_3 über *Ascl* und f_{wt} -S/MAR-W über *BsWI*. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden in analytischen Restriktionsverdaus (Abbildung 2-4) und mittels Sequenzierung auf Richtigkeit und Orientierung überprüft.

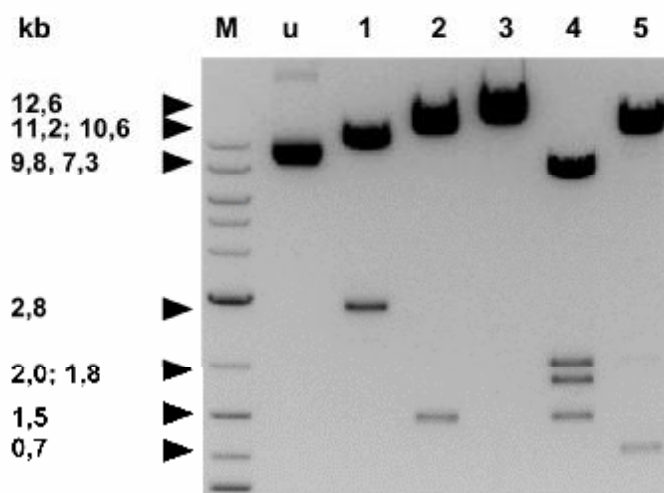


Abbildung 2-4: Restriktionsanalyse des Selektionskonstruktes. Die Vektor-DNA wurde mit den zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen verdaut, in einem 0,8%igen Agarosegel bei 100 V für 1 Std. aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. kb=Kilobasen; M=molekularer Größenstandard (DNA verschiedener doppelsträngiger Plasmide nach vollständigem Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen); u=unverdaute Vektor-DNA; 1=Ascl; 2=BsWI; 3=I-SceI; 4=SalI/BsWI; 5=PacI/SalI.

2.3.3 Nachweis der Markergen-Expression mittels transienter Transfektion

Vor der Generierung stabiler Transfektantenklone wurde nach erfolgreicher Klonierung des Konstruktes dessen Funktionalität in Hinblick auf die Expression und Sezernierbarkeit des Fusionsproteins nachgewiesen. Dazu wurden 1×10^7 serumfrei-kultivierte CHO-Zellen (CHO-DG44, CHO-K1, CHO-Dukx-B11) mit 10 μ g Vektor-DNA elektroporiert und über mehrere Tage sowohl deren EGFP-Expression als auch die Akkumulation des Fusionsproteins im Zellkulturüberstand gemessen.

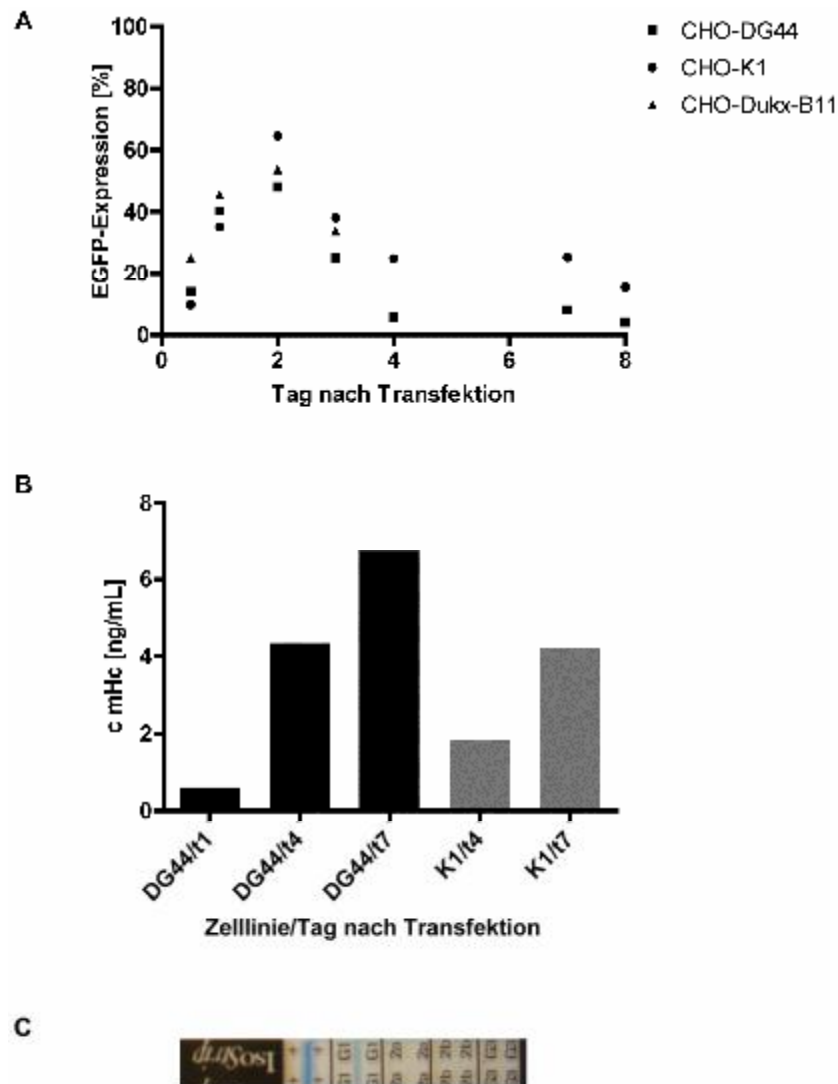


Abbildung 2-5: Nachweis der Expression und Sezernierbarkeit des EGFP-mHc-Fusionsproteins. Transiente Expression des EGFP-mHc in serumfreien CHO-Zelllinien. 1×10^7 Zellen wurden per Elektroporation mit jeweils 10 μ g Vektor-DNA transfiziert und über 8 Tage kultiviert. A) Analyse der EGFP-Fluoreszenz mittels FACS für CHO-DG44, CHO-K1 und CHO-Dukx-B11 im Vergleich zu untransfizierten Kontrollen. CHO-Dukx-B11 waren 4 Tage nach der Elektroporation nicht mehr vital und konnten daher nicht weiter berücksichtigt werden. B)

Analyse des sezernierten Fusionsproteins im Zellkulturüberstand von CHO-DG44- und CHO-K1-Transfektanten mittels ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“). C) Detektion und Isotypisierung des konstanten mIgG1-Teils (G1-Bande) des Fusionsproteins im Zellkulturüberstand mittels IsoStrip (Roche). G1=Bande für Maus-IgG1, +=Positivkontrollbande.; *egfp-mhc*=Fusionsgen aus *egfp* („enhanced green fluorescent protein“) und *mhc* (konstante Region einer Maus-IgG1-Antikörperkette). ng=Nanogramm; mL=Milliliter; c mHc=Konzentration des Fusionsproteins.

Es konnte mit verschiedenen Nachweismethoden gezeigt werden, dass das Fusionsprotein funktionell exprimiert und sezerniert wurde. Intrazellulär konnte EGFP detektiert werden (Abbildung 2-5 A). Der mHc-Teil des im Zellkulturüberstand akkumulierten Fusionsproteins war im Sandwich-ELISA quantifizierbar (Abbildung 2-5 B), und der durchgeführte IsoStrip identifizierte eindeutig eine Maus-IgG1-Kette (Abbildung 2-5 C). Demnach konnte das Selektionskonstrukt zur Generierung der stabilen Transfektanten verwendet werden.

2.3.4 Herstellung stabiler Transfektantenklone

Im Rahmen dieser Arbeit sollte RMCE mit Transfektanten durchgeführt werden, die eine stabile Integration des Selektionskonstruktes (Abbildung 2-3) aufwiesen. Durch Elektroporation mit absteigenden Vektormengen mittels einer DNA-Endpunktverdünnung sollte die Integration von einer bis wenigen Gen-Kopien pro Zelle erreicht werden. Die Integration multipler Kopien stellt ein Risiko für den Erfolg von RMCE dar (Bode *et al.*, 2000b). Klone, bei denen es aufgrund der multiplen Kopien zu unkontrollierten Deletionen, Inversion oder Translokations-Ereignissen kommt (Bode *et al.*, 2000b), sterben mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ab und kommen daher in der Kultur nur zu einem geringen Teil vor. Es wurde trotzdem entschieden, die stabilen Transfektanten nach Subklonierung dem RMCE-Protokoll zu unterziehen, ohne die Gen-Kopienzahl mittels Southern Blot Analysen bestimmt zu haben. Um zu gewährleisten, dass nur einzelne bis wenige Kopien des Selektionskonstruktes ins Genom integrierten, wurden Elektroporationen mit verschiedenen Mengen an linearisiertem Vektor durchgeführt. Verwendet wurden für 2×10^6 vitale Zellen 500 ng, 250 ng, 125 ng und 62,5 ng linearisierte Vektor-DNA. Der applizierte Selektionsdruck nach 48 Stunden betrug 500 $\mu\text{g/mL}$ G418. Nach zwei Wochen konnten auf den Platten mit 500, 250 und 125 ng DNA im Mikroskop CHO-Kolonien identifiziert werden, nicht jedoch für die Elektroporation mit 62,5 ng. Kolonien, die aus der Transfektion mit 125 ng DNA hervorgegangen waren, wurden isoliert und expandiert. Die Kulturen wurden auf Expression

von EGFP und Sekretion des EGFP-mHc analysiert (2.3.3) und in einem RMCE-Experiment auf ihre Austauschbarkeit untersucht.

2.4 Generierung des Austauschkonstruktes

2.4.1 Design und Klonierung

Das Austauschkonstrukt basierte auf dem Vektor pF₃MCSF_{wt} (erhalten von Prof. Jürgen Bode, AG EPI, HZI Braunschweig). Das Fragment F₃MCSF_{wt} wurde durch Restriktionsverdau mit *Nspl* und *Hind*III entfernt und durch ein synthetisch hergestelltes Fragment *Nspl*-f₃MCSf_{wt}-*Hind*III (mit invers orientierter f_{wt}) ersetzt, wodurch der Vektor pEx generiert wurde. Im Anschluss konnten die Antikörperketten eines humanisierten IgG1-Antikörpers (hum.IgG1) inklusive dem jeweils vorangestellten *hcmv*-Promotor („Human cytomegalovirus IE1 promoter“=humaner Zytomegalievirus-Promotor) per PCR auf den Vektoren pSV2-dhfr-hHC-humHCVIgG1 und pSV2-dhfr-hLC-humLCVkappa01 (Busch, 2005a) amplifiziert werden. Die schwere Kette wurde über *Asc*I und *Bs*WI, die leichte Kette über *Bs*WI und *Nhe*I in die multiple Klonierungsstelle (MCS, „multiple cloning site“) kloniert (pExAk). Die Verwendung zweier identischer Promotoren wurde hier als unkritisch in Bezug auf möglicherweise auftretende Promotor-Interferenz betrachtet, da die Verwendung eines dualen Vektorsystems mit den gleichen *hcmv*-Promotoren nach stabiler Transfektion und MTX-Genamplifikation zur Generierung von Antikörper-Hochproduzenten mit einer stabilen spezifischen Produktionsrate von bis zu 35 pcd geführt hat (persönliche Kommunikation mit Dr. Iris Bürger, Miltenyi Biotec GmbH).

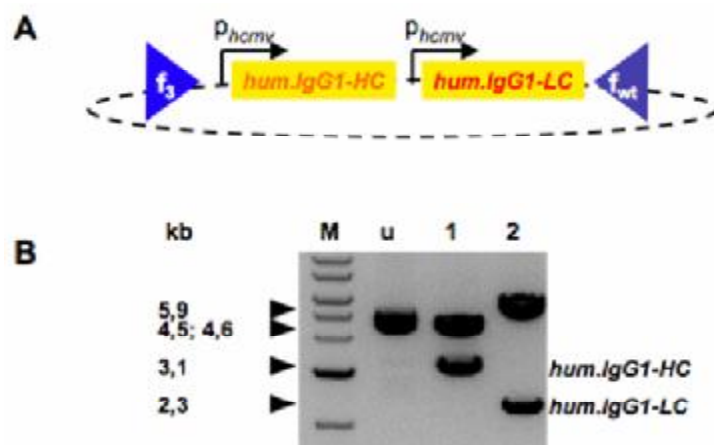


Abbildung 2-6: Aufbau des Austauschkonstruktes pExAk. A) Schematische Darstellung des Konstruktes pExAk. B) Das Austauschkonstrukt pExAk wurde mit den zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen zur Darstellung der klonierten Antikörperketten analytisch verdaut, in einem 0,8%igen Agarose-Gel bei 100 V für 1 Std. aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. M=molekularer Größenstandard (DNA verschiedener doppelsträngiger Plasmide nach vollständigem Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen); u=unverdaute Vektor-DNA; 1=Verdau des Konstruktes mit *Ascl* und *BsWI*; 2=Verdau des Konstruktes mit *BsWI* und *NheI*. f_3 , f_{wt} =FRT(„flippase-recognition-target“-Erkennungsstellen der Fip-Rekombinase; p_{hcmv} =humaner Zytomegalievirus-Promotor („Human cytomegalovirus IE1 promoter“); *hum.IgG1-HC*=schwere Kette eines humanisierten IgG1; *hum.IgG1-LC*=leichte Kette eines humanisierten IgG1; kb=Kilobasen.

Die korrekte Klonierung des pExAk (Abbildung 2-6 A) wurde mittels Restriktionsverdau durch das Ausschneiden der eingebrachten Antikörperketten über die Klonierungsschnittstellen (Abbildung 2-6 B) und mittels Sequenzierung bestätigt.

2.4.2 Nachweis der Austauschgen-Expression mittels transienter Transfektion

Die Funktionalität des Austauschkonstruktes pExAk (Abbildung 2-6 A) in Bezug auf Antikörperexpression wurde zusätzlich durch transiente Transfektion von COS1- und CHO-DG44-Zellen überprüft.

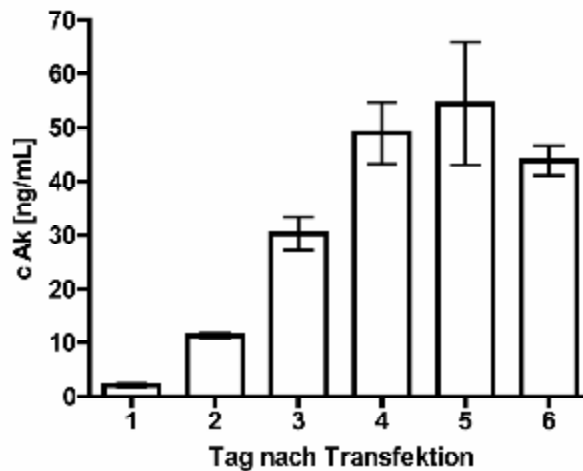


Abbildung 2-7: Transiente Expression des Austauschkonstruktes pExAk in einer serumabhängigen CHO-Zelllinie zur Überprüfung der Funktionalität des Konstruktes in Hinblick auf Sekretion von Antikörper in den Zellkulturüberstand. 2×10^6 Zellen wurden per Elektroporation mit jeweils 10 μg Vektor transfiziert und über 6 Tage kultiviert. Die akkumulierte Konzentration des sezernierten humanisierten IgG1 im Zellkulturüberstand von CHO-DG44-Transfektanten wurde mittels ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) bestimmt. c Ak=Konzentration des humanisierten IgG1-Antikörpers; ng/mL=Nanogramm/Milliliter; Fehlerbalken=Standardabweichung der Ergebnisse von zwei identisch durchgeführten Ansätzen.

Die erfolgreiche Expression des Antikörpers resultierte in seiner Akkumulation im Zellkulturüberstand, die mittels ELISA quantifiziert werden konnte (Abbildung 2-7). An Tag 4 nach der Elektroporation wurde in der CHO-DG44-Kultur eine maximale Konzentration von ungefähr 50 ng Antikörper pro mL Zellkulturüberstand erreicht.

2.5 Austauschbarkeit der *egfp-mhc* Expressionskassette gegen *hum.IgG1*-Gene mittels RMCE

Zehn stabil transfizierte Transfektantenklone wurden auf Austauschbarkeit im RMCE getestet. In diesem Versuch sollte das *egfp-mhc*-Fusionsgen durch die Flp-Rekombinase über die *FRT*-Erkennungsstellen f_3 und f_{wt} gegen die Gene eines humanisierten IgG1-Antikörpers ausgetauscht werden, wie schematisch in Abbildung 2-8 dargestellt.

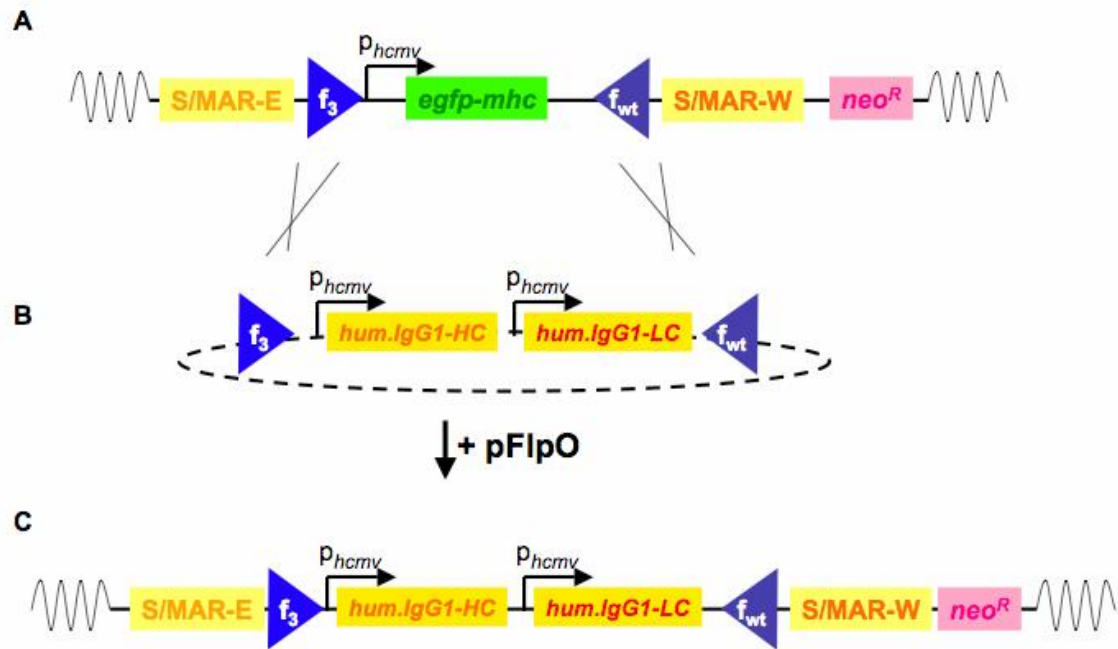


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung des Flp-Rekombinase-vermittelten Kassettenaustauschs des *egfp-mhc*-Fusionsgens gegen *hum.IgG1*-Antikörpergene. Das Selektionskonstrukt mit der über RMCE („recombinase-mediated cassette exchange“) austauschbaren Expressionskassette lag genomisch stabil integriert vor (A). Es erfolgte eine Co-Transfektion des Austauschkonstrukts (pExAk) und des Flp-Rekombinase-Vektors (pFlpO-puro) im Verhältnis 3:1 mittels Lipofektion von ca. 3×10^5 Zellen (B). Nach korrektem Flp-Rekombinase-vermitteltem Kassettenaustausch lagen die *hum.IgG1*-Antikörper-Gene anstelle des *egfp-mhc*-Fusionsgens vor (C). S/MAR-E und S/MAR-W=Scaffold/Matrix-Attachment-Regions; f_3 , f_{wt} =FRT- („flippase-recognition-target“) Erkennungsstellen der Flp-Rekombinase; Flp=pFlpO-puro; p_{hcmv} =humaner Zytomegalievirus-Promotor („Human cytomegalovirus IE1 promoter“); *egfp-mhc*=Fusionsgen aus *egfp* („enhanced green fluorescent protein“) und *mhc* (konstante Region einer Maus-IgG1-Antikörperkette); *hum.IgG1-HC*=Gen für die schwere Kette eines humanisierten IgG1-Antikörpers; *hum.IgG1-LC*=Gen für die leichte Kette eines humanisierten IgG1-Antikörpers; *neo^R*=Neomycin-Resistenzgen und pSV2-neo-Vektorsequenzen.

Die Co-Transfektion der Austausch- und Flp-Rekombinase-Konstrukte wurde per Lipofektion im Verhältnis 3:1 durchgeführt. Einen Tag nach Transfektion wurde für 48 Std. mit 2,5 µg/mL Puromycin auf die transiente Expression des FlpO-puro selektioniert (Qiao *et al.*, 2009). Daraufhin lag eine Mischkultur vor, deren Zellen theoretisch folgende genomische Konstellationen aufweisen konnten:

RMCE	Genkopien	Expressionsphänotypen	
		EGFP-mHc	hum.IgG1
vollständig	1	-	+
vollständig	>1	-	+
partiell	>1	+	+
-	≥1	+	+

Tabelle 2-1: Mögliche Expressionsphänotypen für Mischkulturen nach RMCE. RMCE=„recombinase-mediated cassette exchange“; EGFP-mHc=Fusionsprotein aus EGFP („enhanced green fluorescent protein“) und mHc (konstante Region einer Maus-IgG1-Antikörperkette); hum.IgG1= humanisierter IgG1-Antikörper.

Zusätzlich musste erwartet werden, dass ein Teil der Zellen nicht erfolgreich co-transfiziert werden konnte und demnach keine genomische Veränderung aufwies. Da aufgrund der verschiedenen möglichen Expressionseigenschaften der einzelnen Zellen der Mischkulturen keine klare Aussage über den Erfolg des RMCE getroffen werden konnte, mussten die Mischkulturen vereinzelt und die Subklone auf genomischer Ebene analysiert werden.

Um bei der Analyse der RMCE-Mischkulturen schon eine Information über die Wahrscheinlichkeit eines spezifischen Kassettenaustauschs im Vergleich zu einer unspezifischen Integration zu erhalten, wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt:

Ansatz	Kontrollfunktion	Vektoren	Puromycin-Selektion
E	unspezifische Integration des Austausch-Vektors	pEx	-
F	spezifische enzymvermittelte Exzisionen bei Mehrkopien-Klonen	pFlpO-puro	+
E/F	RMCE	pEx + pFlpO-puro	+

Tabelle 2-2: Übersicht der Transfektionen und Kontrollen für den RMCE-Versuch. RMCE=Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch.; pEx=Austauschkonstrukt; pFlpO-puro=Flp-Rekombinase-Vektor.

Um die unterschiedlichen genomischen Konstellationen und die daraus resultierenden Expressionsphänotypen zu analysieren, wurden für die Beurteilung der Mischkulturen die beschriebenen Kontrollen parallel mitgeführt.

2.5.1 Selektionsstrategie für Kulturen mit erfolgreichem RMCE

2.5.1.1 Analyse von RMCE-Mischkulturen auf EGFP-Expression

Der RMCE (Abbildung 2-8) wurde durchgeführt und die daraus resultierenden Mischkulturen nach fünf und zwölf Tagen auf ihre EGFP-Niveaus analysiert. Die Abbildung 2-9 zeigt, dass einige Ansätze eine deutlich verringerte Expression im Vergleich zu den Kontrollen E und F aufwiesen. Zusätzlich wiesen diese Kulturen nach 14 Tagen messbare hum.IgG1-Konzentrationen im Vergleich zum Ansatz E (Transfektion nur mit pExAk) auf, bei dem es sich um eine Kontrolle für die unspezifische Integration der Antikörpergene ins Genom handelte. Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass in den entsprechenden Ansätzen keine nachweisbare, zufällige Integration des Antikörper-Vektors ins Genom aufgetreten war, sondern die Antikörperexpression in den RMCE-Ansätzen vorrangig durch einen ortsspezifischen gerichteten Austausch zustande kam.

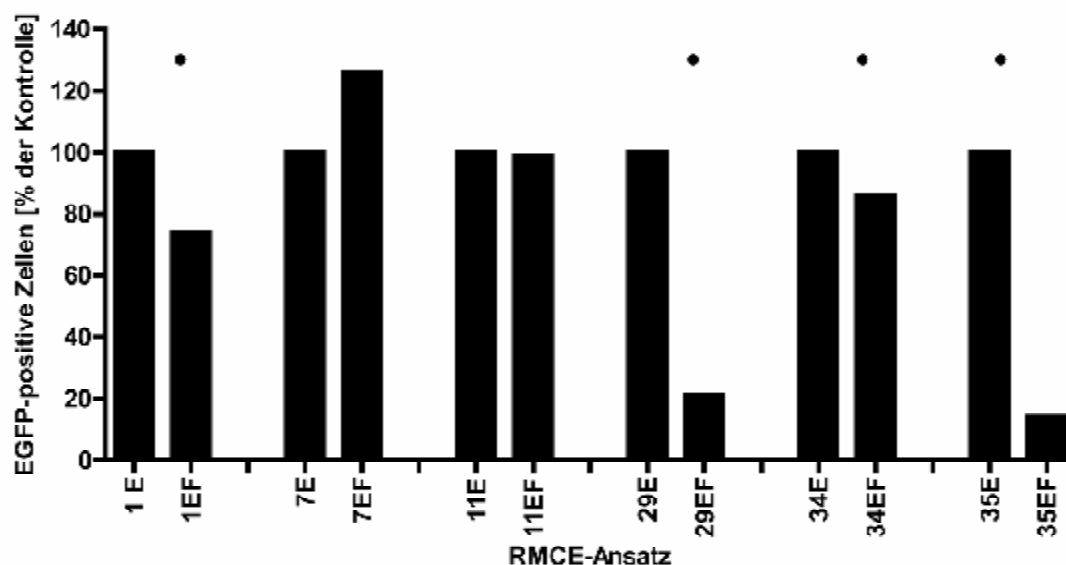


Abbildung 2-9: Analyse der EGFP-Expression der auf RMCE-Kompatibilität getesteten Kulturen in Abhängigkeit vom Flp-Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch. Dargestellt sind die EGFP-Expressionsniveaus von verschiedenen RMCE-Ansätzen und den zugehörigen Kontrollen zwölf Tage nach der Transfektion. Einen Tag vor der Transfektion wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in 6-Napf-Zellkulturplatten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Co-Transfektion des Austauschkonstrukts (pExAk) und des Flp-Rekombinase-Vektors (pFlpO-puro) im Verhältnis 3:1 mittels Lipofektion. Einen Tag nach Transfektion wurden die Ansätze für 24 Std. mit $2,5 \mu\text{g/mL}$ Puromycin behandelt und im Anschluss ohne Applikation eines Selektions-Antibiotikums kultiviert. Mehrere Tage nach Transfektion wurde die EGFP-Expression in einer durchflusszytometrischen Analyse (MACSQuant) analysiert. Die Punkte markieren RMCE-Ansätze (E/F), die aufgrund ihres reduzierten EGFP-Signals im Vergleich zur Kontrolle subkloniert wurden. E/F=RMCE mit pExAk und pFlpO-puro; E=pExAk (Kontrolle für die unspezifische Integration der Antikörperketten-Gene ins Genom), siehe auch Tabelle 2-2.

Die in Abbildung 2-10 exemplarisch dargestellte durchflusszytometrische Analyse des RMCE-Ansatzes 29 verdeutlicht die starke Heterogenität der EGFP-Expression für die Mischkultur nach dem Experiment. Zu beachten ist, dass eine Transfektion nie für alle Zellen erfolgreich sein kann, weil nicht alle Zellen im Transfektionsansatz DNA aufnehmen (Xiong *et al.*, 2005). Zudem findet ein Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch nur für einen Teil der Zellen statt. Darin liegt die Heterogenität der Mischkultur begründet. Es mussten zudem für die RMCE-Mischkulturen neben dem erfolgreichen vollständigen Kassettenaustausch alle weiteren in 2.5 beschriebenen Expressionsphänotypen angenommen werden, da der genomische Status der Zellen zum Zeitpunkt der Analyse nicht bekannt war. Daher wurden die Kulturen nach RMCE subkloniert, um Klone auf genomischer Ebene analysieren zu können. Die Auswahl der Kulturen 1, 29, 34 und 35 für die

Subklonierung wurde, wie in der Abbildung 2-9 dargestellt, davon abhängig gemacht, dass bei dem entsprechenden RMCE-Ansatz das EGFP-Signal nach 12 Tagen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich reduziert war.

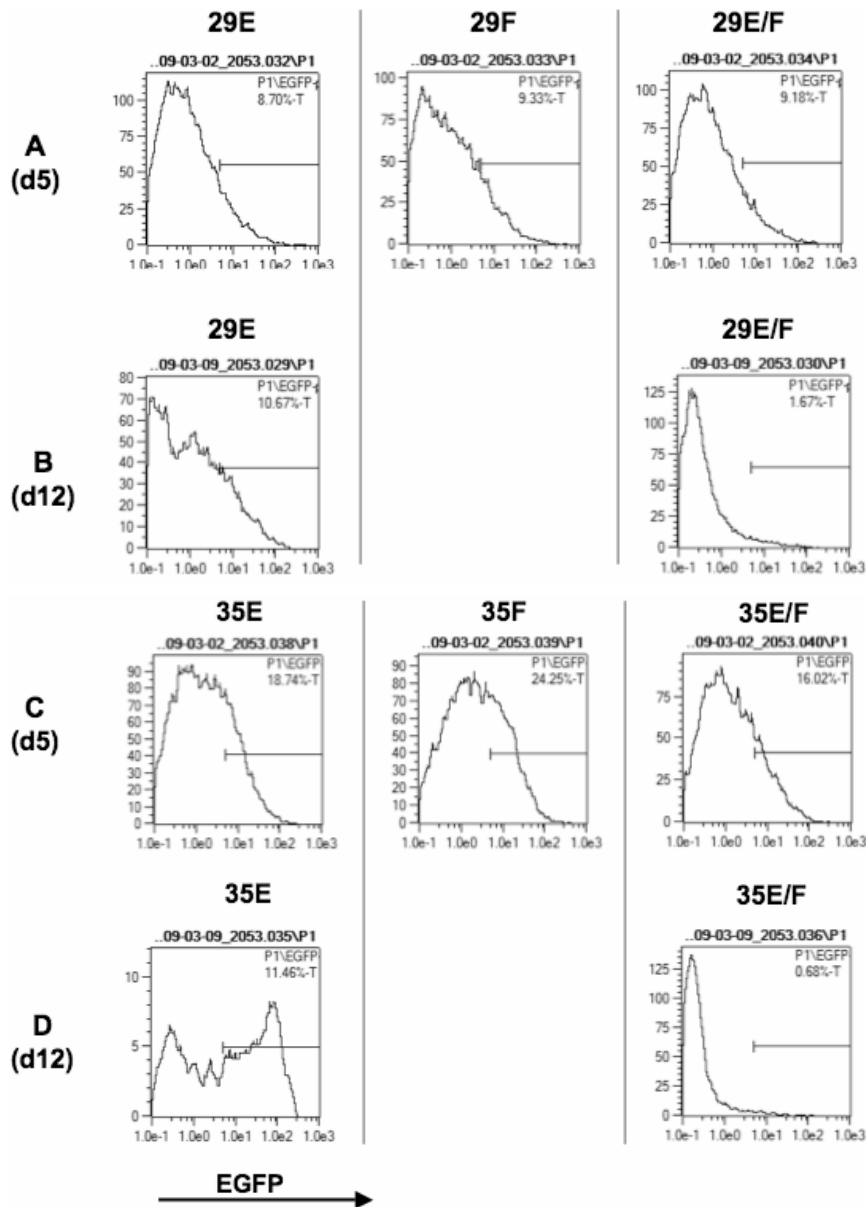


Abbildung 2-10: Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse (MACSQuant) zweier ausgewählter RMCE-Ansätze nach fünf und zwölf Tagen. Einen Tag vor der Transfektion wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in 6-Napf-Zellkulturplatten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Co-Transfektion des Austauschkonstrukts (pExAk) und des Flp-Rekombinase-Vektors (pFlpO-puro) im Verhältnis 3:1 mittels Lipofektion. Einen Tag nach Transfektion wurden die Ansätze für 24 Std. mit $2,5 \mu\text{g/mL}$ Puromycin behandelt und im Anschluss ohne Applikation eines Selektions-Antibiotikums kultiviert. Mehrere Tage nach Transfektion wurde die EGFP-Expression in einer

durchflusszytometrischen Analyse (MACSQuant) analysiert. A, C=Analyse an Tag 5 nach RMCE; B, D=Analyse an Tag 12 nach RMCE, Kontrolle F konnte nicht gemessen werden. EGFP (enhanced green fluorescent protein)=Fluoreszenz des EGFP, Messung im FITC-Kanal; E=pExAk (Kontrolle für die unspezifische Integration der Antikörperketten-Gene ins Genom); F=pFlpO-puro (Kontrolle für die spezifische Reduktion des EGFP-Signals vermittelt durch die Flp-Rekombinase ohne Austausch); E/F=RMCE mit pExAk und pFlpO-puro (siehe auch Tabelle 2-2); %-T=Anteil der markierten EGFP-positiven Population an der gesamten dargestellten Population.

2.5.1.2 Analyse von Subklonen nach RMCE

Wie in 2.5.1.1 beschrieben, war für die Mischkulturen nach dem RMCE-Ansatz weder auf Expressions- noch auf Genomebene eine eindeutige Bewertung des Versuchserfolges möglich. Kulturen, die aufgrund ihrer Expressionseigenschaften vermutlich erfolgreich ausgetauschte Klone enthielten, mussten daher nach dem RMCE-Ansatz zunächst subkloniert werden, um aussagekräftige Analysen durchführen zu können.

Dazu wurden 1920 Subklone (aus nach Abbildung 2-9 ausgewählten RMCE-Ansätzen) zunächst im ELISA auf hum.IgG1-Expression getestet. 70 Klone, die dabei als hum.IgG1-positiv identifiziert werden konnten, wurden zur weiteren Untersuchung expandiert. 55 dieser 70 Klone konnten erfolgreich expandiert werden und wurden nun weiter phänotypisch auf ein erfolgreiches RMCE-Ereignis untersucht. Dazu wurde wiederum die EGFP-Expression der Kulturen gemessen. Es wurden verschiedene Expressionsprofile festgestellt. Ein Teil der Subklone zeigte keine Reduktion des EGFP-Signals (z.B. Klon 35.2B1, Abbildung 2-11). Insgesamt 26 der analysierten Klone zeigten in der durchflusszytometrischen Analyse im MACSQuant ein im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziertes EGFP-Signal (70–30 %), wobei teilweise unterschiedliche Populationen auftraten (z.B. Klon 29.3B2, Abbildung 2-11).

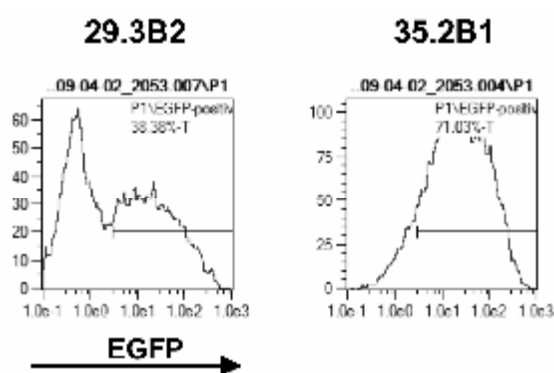


Abbildung 2-11: EGFP-Expression exemplarisch für zwei Subklone nach RMCE-Ansatz. 12 Tage nach RMCE wurden Kulturen mit reduziertem EGFP-Niveau im Vergleich zur Kontrolle identifiziert (Abbildung 2-10) und mit einer Zelle pro Napf in 96-Napf-Zellkulturplatten ausgesät. Proliferierte Klone wurden expandiert und auf ihr EGFP-Expressionsprofil im MACSQuant analysiert. Dargestellt ist die EGFP-Expression für zwei ausgewählte

Subklone. EGFP=“enhanced green fluorescent protein“, Fluoreszenz des EGFP bei Messung im FITC-Kanal; %-T=Anteil der markierten Population an der gesamten dargestellten Population.

Ein zusätzlich zur EGFP-Expression wichtiges Kriterium für erfolgreichen RMCE war, wie bereits erwähnt, die stabile hum.IgG1-Expression. Nach der Expansion waren allerdings nur noch 13 Klone eindeutig hum.IgG1-positiv. Dies konnte entweder damit zusammenhängen, dass der Austauschvektor pExAk zum Zeitpunkt des analytischen ELISA noch transient exprimiert worden war, oder damit, dass eine zufällige, RMCE-unabhängige Integration ins Genom stattgefunden hatte.

2.5.2 Identifikation eines positiven RMCE-Subklons aufgrund seiner Expressionseigenschaften

Die oben beschriebenen Expressionsphänotypen wurden festgestellt, um potentiell positive RMCE-Subklone zu ermitteln. Nach RMCE wurden, wie in 2.5.1.2 beschrieben, sehr unterschiedliche Expressionsprofile beobachtet. Es wurden allerdings insgesamt nur zwei Kulturen identifiziert, die größtenteils EGFP-negative Zellen aufwiesen und hum.IgG1 in den Zellkulturüberstand sezernierten. Dies deutete auf ein positives RMCE-Ereignis hin. Die Heterogenität der Expression von Klon 29.2D12 (Abbildung 2-12), der immerhin noch 3,73 % EGFP-positive Zellen besaß, zeigt jedoch deutlich, dass es sich dabei noch nicht um eine reine Subkultur handelte, sondern weiterhin um eine heterogene Mischkultur. Kultur 29.2D12 wurde daher erneut subkloniert.

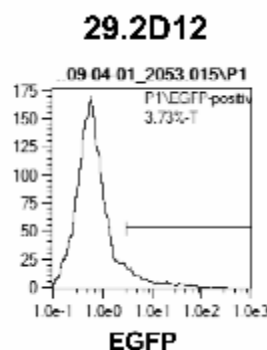


Abbildung 2-12: EGFP-Expression des potentiell RMCE-positiven Subklons 29.2D12. 12 Tage nach RMCE wurden Kulturen mit reduziertem EGFP-Niveau im Vergleich zur Kontrolle identifiziert (Abbildung 2-10) und mit einer Zelle pro Napf in 96-Napf-Zellkulturplatten ausgesät. Proliferierte Klone wurden expandiert und ihr EGFP-Expressionsprofil im MACSQuant analysiert. Dargestellt ist der Klon 29.2D12, der aufgrund seines

Expressionsphänotyps als potentiell RMCE-positiv eingestuft wurde. EGFP=“enhanced green fluorescent protein“, Fluoreszenz des EGFP bei Messung im FITC-Kanal; %-T=Anteil der markierten Population an der gesamten dargestellten Population.

2.5.3 Analyse von 29.2D12-Subklonen auf Antikörper-Expression

Die Kultur 29.2D12 wurde mit 0,5 Zellen pro Napf in 2880 Näpfen erneut ausgesät. Proliferierende Klone wurden isoliert und auf neue Zellkulturplatten, die so genannten Sammelplatten, umgesetzt. Nach zwei bis vier Tagen, in denen der sezernierte Antikörper im Medium akkumuliert sein sollte, wurden dann ELISA-Messungen durchgeführt. Entsprechend der Auswahlstrategie sollte es hierbei möglich sein, mittels ELISA zum Nachweis von Maus- und Human-IgG1 solche Subklone zu identifizieren, bei denen durch einen ortsspezifischen und Rekombinase-vermittelten Austausch das *egfp-mhc*-Fusionsgen durch die *hum.IgG1*-Gen-Kassette ersetzt worden war. Dementsprechend handelte es sich bei solchen Subklonen, die ausschließlich positiv für mIgG1 waren, um Klone, bei denen RMCE nicht erfolgreich gewesen war. Bei hum.IgG-positiven Subklonen konnte angenommen werden, dass der RMCE erfolgreich verlaufen war. Es bestand jedoch ebenso die Möglichkeit, dass diese Klone die *hum.IgG1*-Antikörpergene zufällig in ihr Genom integriert und zusätzlich die Expression des EGFP-mHc gestoppt hatten (2.5.1).

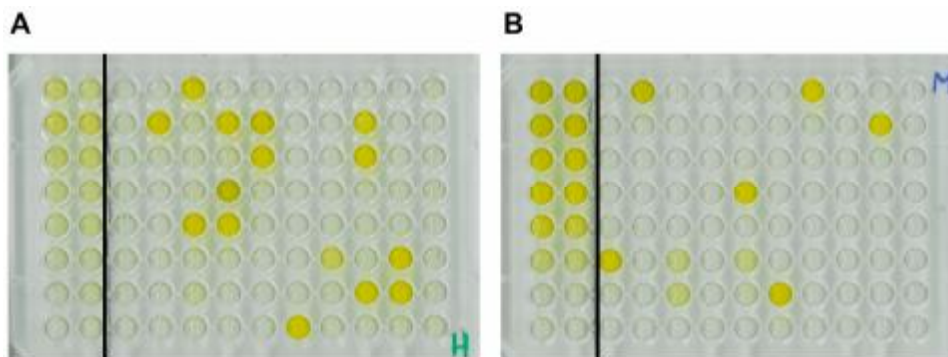


Abbildung 2-13: Exemplarische Darstellung eines ELISA von Zellkulturüberständen der 29.2D12-Subklone zur Identifikation potentiell RMCE-positiver Klone. (A) Detektion von humanisierten IgG1-Antikörpern und (B) dem konstanten Bereich der schweren Kette von Maus-IgG1-Antikörpern (als Bestandteil des EGFP-mHc-Fusionsproteins). Klone, die zwei Wochen nach Subklonierung erfolgreich proliferierten, wurden in Sammelplatten umgesetzt und für 2-4 Tage kultiviert. Dann wurden die Zellkulturüberstände mit den akkumulierten Antikörpern in den ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) eingesetzt. Standardreihe=jeweils Spalte 1 und 2 der Platten:

Maus-IgG1- bzw. chimärer IgG1-Antikörper mit 25 ng/mL bis 0,78 ng/mL in seriellen Verdünnungen und Leerprobe.

In Abbildung 2-13 ist der ELISA zur Analyse der akkumulierten Antikörper im Zellkulturüberstand (mittels Detektion der konstanten Bereich der schweren Kette von Maus-IgG1-Antikörpern als Teil des Fusionsproteins und humanisierter IgG1-Antikörperketten) für eine 29.2D12-Sammelplatte exemplarisch dargestellt: In Teil A befindet sich der ELISA zur Detektion von hum.IgG1-Molekülen, in Teil B der ELISA zur Detektion des Fusionsproteins über die murine IgG1-Kette.

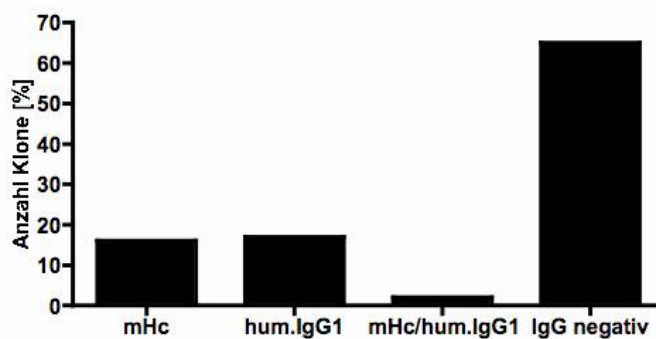


Abbildung 2-14: Vergleichende quantitative Darstellung der Expression von humanisierten IgG1-Antikörpern und dem konstanten Bereich der schweren Kette von Maus-IgG1-Antikörpern für 29.2D12-Subklone im ELISA. mHc=konstanter Bereich der schweren Kette von Maus-IgG1-Antikörpern als Bestandteil des EGFP-mHc-Fusionsproteins; hum.IgG=humanisierter IgG1-Antikörper.

Die Analyse von Subklonen aus RMCE-Ansätzen mittels ELISA wurde für insgesamt 320 Subklone durchgeführt. Davon waren 16 % mIgG1-positiv, 17 % hum.IgG1-positiv, 2 % positiv für sowohl mIgG1 als auch für hum.IgG1, und 65 % der analysierten Subklone zeigten keine IgG-Expression im ELISA (Abbildung 2-14).

2.5.4 Authentifizierung von potentiell RMCE-positiven Klonen auf genomischer Ebene

Die Aussage über den Erfolg des RMCE war bei hum.IgG1-positiven Klonen auf Expressionsebene nicht eindeutig und musste mittels PCR-Analysen, d.h. Nachweis der Defizienz des *egfp-mhc*-Gens auf genomischer Ebene, bewiesen werden. Dazu konnten 26

der im ELISA hum.IgG1-positiven und mlgG1-negativen Subklone erfolgreich expandiert und deren genomische DNA gewonnen werden.

Im Falle eines vollständigen Kassettenaustauschs in Einzel- oder Mehrkopie-Klonen war folgender Genotyp zu erwarten: die Klone durften keine *egfp*- und *mhc*-Gene mehr tragen, dafür mussten sie – entsprechend dem sezernierten Antikörper – *hum.IgG1*-Antikörperketten aufweisen (siehe auch Tabelle 2-1). Das Gen *neo^R* diente in dieser Analyse als interne Kontrolle für die Amplifizierbarkeit von Fragmenten in unmittelbarer örtlicher Nähe zum RMCE-Ereignis, da es beim RMCE aufgrund seiner Positionierung außerhalb der *FRT*-flankierten RMCE-Kassette nicht ausgetauscht worden sein sollte. Daher sollten die durchgeführten PCR-Analysen in einer Amplifikation der *hum.IgG1*- und *neo^R*-Gene, nicht jedoch der *egfp*- und *mhc*-Gene, resultieren.

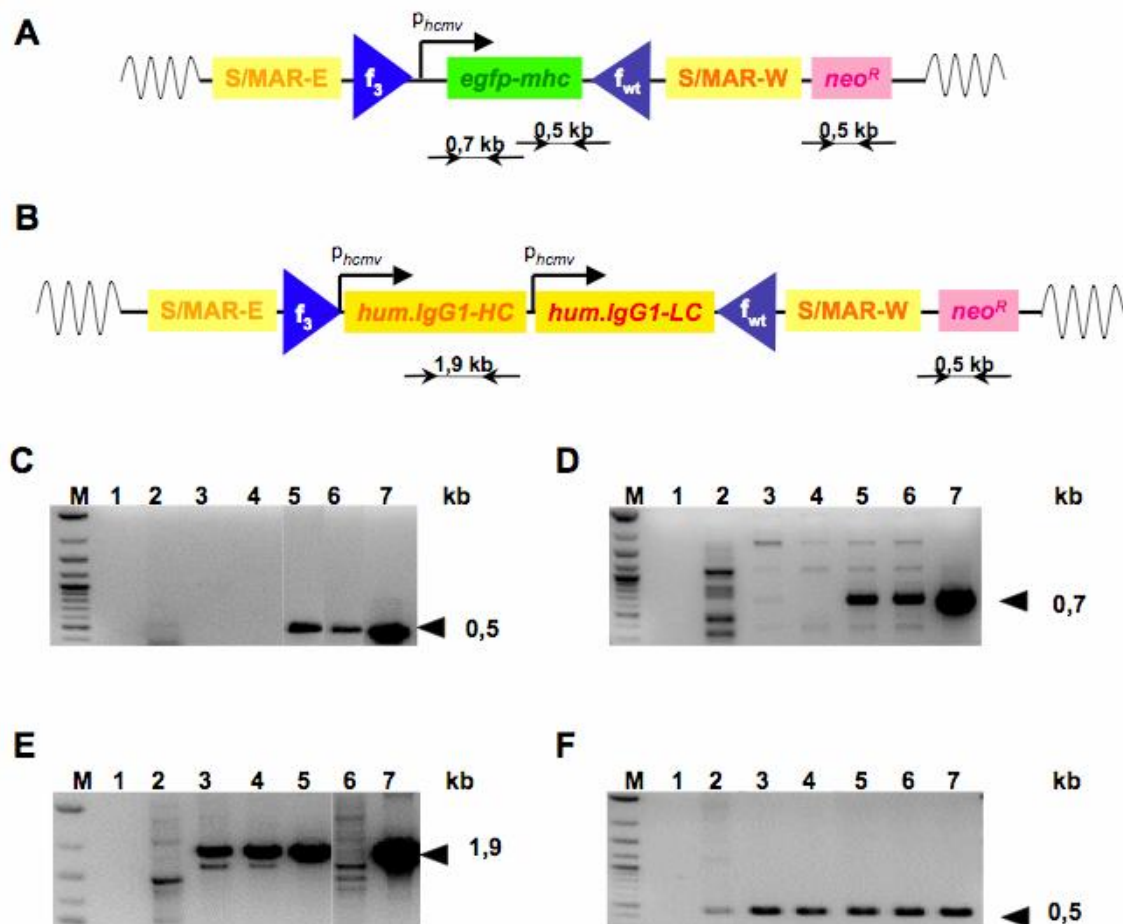


Abbildung 2-15: PCR auf genomischer DNA zur Bestätigung des RMCE von *egfp-mhc* gegen *hum.IgG1*-Antikörperketten. Schematische Darstellung der Expressionskassette vor (A) und nach (B) erfolgreichem RMCE mit den erwarteten PCR-Fragmenten. Gezeigt sind die PCR-Amplifikate („polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion) des *mhc*-Gens (C) und des *egfp*-Gens (D), die beide für einen erfolgreichen

Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch aus dem Genom entfernt sein mussten, und des Gens der schweren *hum.IgG1*-Kette (E) und des *neo^R*-Gens (F), die nach erfolgtem Kassettenaustausch genomisch etabliert sein mussten. Die PCR-Proben wurden in einem 1%igen Agarose-Gel bei 100 V für 1 Std. aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. M=molekularer Größenstandard (DNA verschiedener doppelsträngiger Plasmide nach vollständigem Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen); kb=Kilobasen; 1=Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne DNA-Matrize); 2=wtDNA (genomische DNA untransfizierter CHO-DG44-Zellen); 3=Klon 29.2D12-6G12; 4=Klon 29.2D12-6H4; 5=doppelt-positiver Klon (mIgG1- und hum.IgG1-positiv im ELISA) als Positivkontrolle für die genomische DNA; 6=potentiell RMCE-negativer Klon (mIgG1-positiv und hum.IgG1-negativ im ELISA); 7=Positivkontrolle (entsprechender Vektor als Matrize).

Die durchgeführten PCR-Analysen bestätigten den erfolgreichen RMCE für 12 von 26 analysierten Klonen (46 %). Bei weiteren 12 Klonen war kein RMCE erfolgt. 0,9 % (2 Klone) waren positiv für *egfp-mhc* und *hum.IgG1*, was darauf schließen ließ, dass hier eine zufällige Integration der Antikörpergene ins Genom aufgetreten war, und das Selektionskonstrukt noch intakt aber eventuell mit reduzierter Kopienzahl im Genom vorlag. Die interne Kontrolle *neo^R* konnte auf allen genomischen Proben erfolgreich amplifiziert werden, was auf eine ortsspezifische Integration mittels Flp-Rekombinase hindeutet.

Diese Ergebnisse sollten des Weiteren auf genomischer Ebene mittels Southern Blot bestätigt werden. Zusätzlich wurde damit die Anzahl der Transgen-Kopien überprüft. Die Strategie des Southern Blot ist in Abbildung 2-16 dargestellt. Der Nachweis erfolgte mittels DIG-System (Roche, Mannheim) über eine *hcmv*-Sonde.

Für einen erfolgreichen RMCE waren dabei nach Restriktionsverdau mit *BlnI* sowohl detektierte DNA-Fragmente mit einer definierten Größe von 3,0 kb für ein zentrales Fragment, als auch mit einer Größe von mindestens 4,5 kb für ein Randfragment zu erwarten. Die Anzahl der detektierten Fragmente ließ dabei einen direkten Rückschluss auf die Kopienzahl der integrierten Transgene zu.

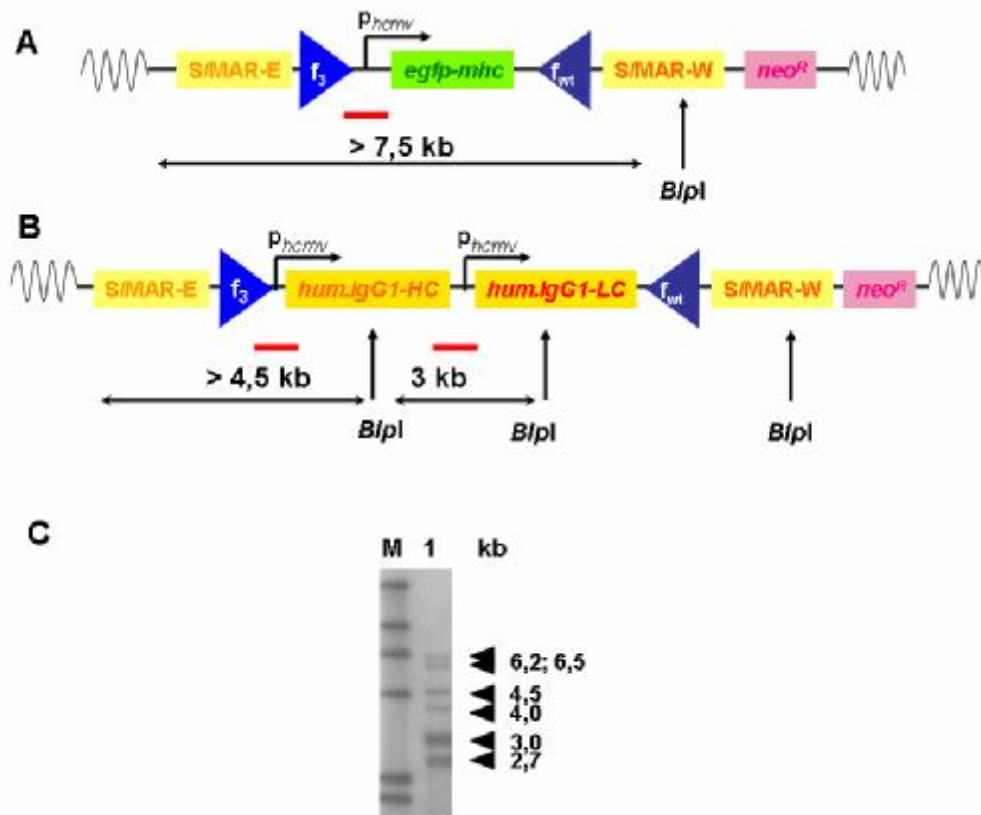


Abbildung 2-16: Southern Blot Analyse zur Authentifizierung von RMCE-positiven Klonen. Darstellung der Strategie der Southern Blot Analyse: die genomische DNA des Klons 29.2D12-6H4 wurde mit *BipI* präparativ verdaut. Die Restriktionsendonuklease schneidet im hinteren Bereich der S/MAR-W und jeweils im vorderen Bereich der konstanten Regionen von schwerer und leichter *hum.IgG1*-Kette. Ist kein RMCE erfolgt (A), ergibt sich eine einzelne Bande für jedes Integrationsereignis, die bei Hybridisierung mit der *hcmv*-Sonde (rot) bei >7,5 kb liegt. Für erfolgreichen RMCE (B) wird eine definierte 3 kb-Bande und eine Bande mit >4,5 kb im Randbereich erwartet. Auch hier ergibt sich bei Hybridisierung mit der *hcmv*-Sonde (rot, C) eine einzelne Bande für jedes Integrationsereignis, so dass an der Bandenanzahl die Transgen-Kopienzahl abgelesen werden kann. M=molekularer Größenstandard, λ -DNA nach *HindIII*-Verdau, DIG-markiert (Roche, Mannheim); kb=Kilobasen; 1=RMCE-positiver Klon; S/MAR-E und S/MAR-W=Scaffold/Matrix-Attachment-Regions; f_3 , f_w =FRT („flippase-recognition-target“-Erkennungsstellen der Flp-Rekombinase; Flp=pFlpO-puro; p_{hcmv} =humaner Zytomegalievirus-Promotor („Human cytomegalovirus IE1 promoter“); *egfp-mhc*=Fusionsgen aus *egfp* („enhanced green fluorescent protein“) und *mhc* (konstante Region einer Maus-IgG1-Antikörperkette); *hum.IgG1-HC*=Gen für die schwere Kette eines humanisierten IgG1-Antikörpers; *hum.IgG1-LC*=Gen für die leichte Kette eines humanisierten IgG1-Antikörpers; *neo^R*=Neomycin-Resistenzgen und pSV2-neo-Vektorsequenzen.

Wie die detektierten DNA-Fragmente der Größe 4,5 sowie 6,2 und 6,5 kb zeigen, trug der dargestellte Klon einzelne Gen-Kopien an drei verschiedenen Gen-Orten. Somit konnte eine zusätzliche Integration des Vektors pExAk mittels dieser Southern-Blot-Strategie gezeigt werden. Allerdings liegen die 2,7- und 4,0-kb-Banden weder in einer unspezifischen Integration noch in einem ortsspezifischen RMCE begründet. Daher wurde eine weitere PCR-Analyse durchgeführt, mit deren Hilfe überprüft werden sollten, ob Fragmente des Austauschvektors genomisch integriert waren. Diese basierte auf der Amplifikation von Vektorsequenzen des pExAk. Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass sie eine Amplifikation eines Fragments außerhalb der RMCE-Kassette ermöglichten, jedoch keine Spezifität für das Selektionskonstrukt aufwiesen. Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass die im Southern Blot als Mehrkopienzahl-Klone identifizierten Kulturen eine zusätzliche Integration des pExAk aufwiesen (Daten nicht gezeigt), womit die unspezifischen Signale im Southern Blot erklärt werden konnten.

2.6 Charakteristika der identifizierten hum.IgG1-Expressionszelllinien

Die Klone, die aus dem RMCE des *egfp-mhc*-Fusionsgens gegen die *hum.IgG1*-Antikörperketten-Gene hervorgegangen waren, sollten, wenn die Expressionseigenschaften dies zuließen, zur Produktion des integrierten rekombinanten Antikörpers unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen für Forschungsansätze genutzt werden. Entscheidend dafür war vor allem eine gute spezifische Antikörperproduktivität, da diese maßgeblich entscheidend ist für eine Verwendung der etablierten Zelllinie für die Produktion.

2.6.1 Spezifische Produktivität

Zur Bestimmung der spezifischen Produktionsraten der aus der Kultur 29.2D12 gewonnenen RMCE-Klone wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

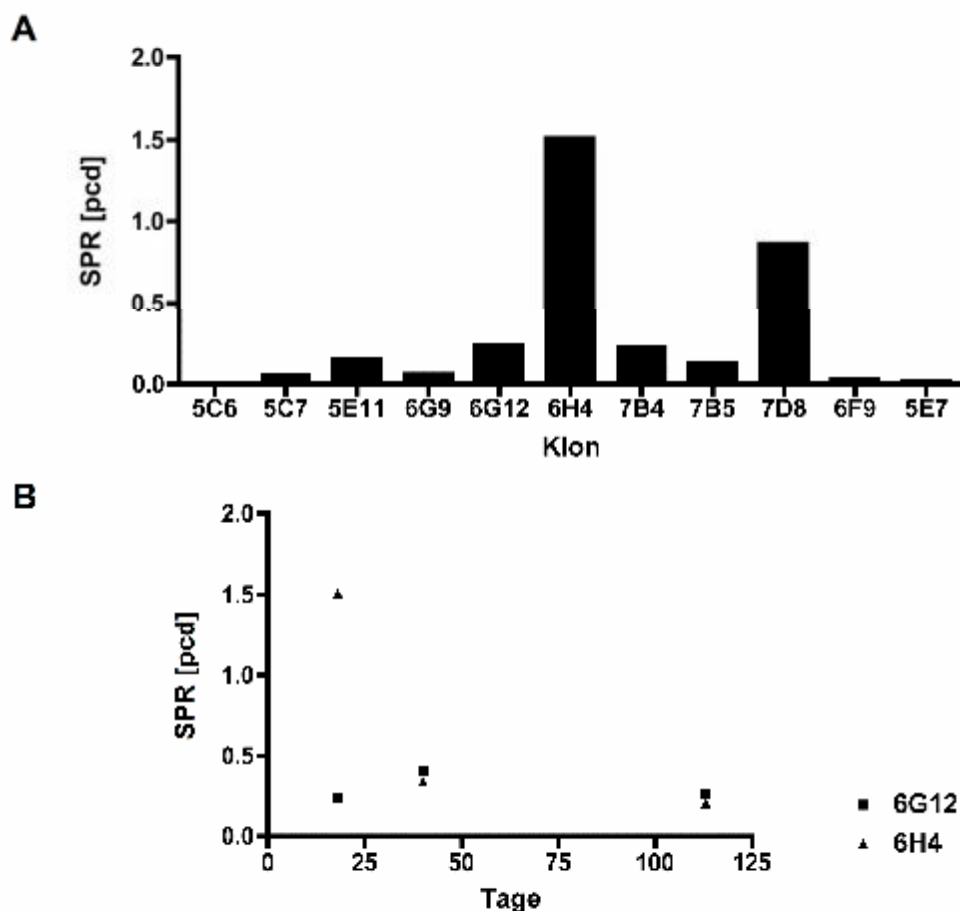


Abbildung 2-17: Darstellung der spezifischen hum.IgG1-Produktionsraten ausgewählter RMCE-Klone. Die RMCE-positiven 29.2D12-Subklone wurden mit 2×10^6 oder 3×10^6 Zellen pro mL in frisches Kulturmedium ausgesät und für 48 oder 72 Std. kultiviert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerkammer erhoben, die Antikörperkonzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt und die SPR berechnet. SPR=Spezifische Produktionsrate; pcd=Einheit der SPR (pg/Zelle/24 Std.).

Die beiden besten Produzentenklone 29.2D12-7D8 und 29.2D12-6H4 erreichten unmittelbar nach ihrer Identifikation als RMCE-positive Klone spezifische Produktionsraten von 0,9 und 1,5 pcd. Nach einigen Wochen zeigten sich für diese Klone deutlich reduzierte spezifische Produktionsraten von unter 0,5 pcd. Dies könnte möglicherweise an einer späten Stilllegung der Gen-Expression liegen. Zu beachten war hierzu, dass zwischen dem Zeitpunkt der Transfektion zur Generierung der stabilen EGFP-mHc-Produzenten als Ausgangssituation für das RMCE-Experiment und der ersten Bestimmung spezifischer Produktivitäten für daraus hervorgegangene Klone aufgrund der vielen Subklonierungsschritte ein Zeitraum von sieben Monaten lag. Da die Auswahl der Klone in dieser Zeit ausschließlich nach

phänotypischen Gesichtspunkten erfolgte, musste davon ausgegangen werden, dass das Transgen bis zur quantitativen Produktionsratenbestimmung stabil exprimiert wurde und es erst zu diesem späten Zeitpunkt zu einer deutlichen Reduktion der Produktivität, kam.

Für monoklonale Antikörper-Expressionen im pharmazeutischen Maßstab werden Zelllinien mit spezifischen Produktivitäten von unter 20 pg/Zelle/Tag (pcd) für die industrielle Produktion von vornherein ausgeschlossen (Wurm, 2004). Die Produktivität der etablierten Klone lag mit den erreichten Werten von maximal 1,5 pcd weit darunter. Um die spezifische Produktivität der Klone zu steigern, wurde der Einfluss des Histon-Deacetylase-Inhibitors Natrium-Butyrat auf die generierten RMCE-positiven Subklone 29.2D12-6H4 und 29.2D12-7D8 untersucht.

Es wurden jeweils zwei Proben der Kulturen mit definierter Zellzahl ausgesät. Das Kulturmedium einer der Kulturen wurde mit 5 mM Natrium-Butyrat supplementiert und die hum.IgG1-Antikörper-Konzentration im Zellkulturüberstand nach 48 bis 72 Std. festgestellt. Die Bestimmung der spezifischen Produktionsrate der mit Natrium-Butyrat versetzten Kultur ergab allerdings keinen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zu der Kultur ohne Natrium-Butyrat (Daten nicht gezeigt).

2.6.2 RMCE II - Wiederholte Austauschbarkeit der Expressionskassette

Das RMCE-System verspricht eine wiederholte Austauschbarkeit der *FRT*-flankierten Expressionskassette. Daher wurde überprüft, ob ein erneuter Austausch für die generierten RMCE-positiven Klone 29.2D12-6H4 und 29.2D12-7D8 möglich war. Dabei sollte die im ersten RMCE integrierte Antikörperkassette gegen ein Hygromycin-Thymidinkinase-Fusionsgen (*hygTk*) ausgetauscht werden. Hier war eine Selektion auf RMCE-positive Zellen über die durch RMCE erlangte Hygromycin B-Resistenz möglich.

2.6.2.1 Generierung des Austauschkonstruktes pExHygTk

Das Austauschkonstrukt pExHygTk basierte auf dem Vektor pEx, dessen Generierung in 2.4.1 erläutert wurde. Das Gen *hygTk* wurde per PCR auf dem Plasmid pHygTkfus (erhalten von Prof. Jürgen Bode, AG EPI, HZI Braunschweig) amplifiziert und über die Schnittstellen *AscI* und *NheI* in die MCS kloniert (pExHygTk).

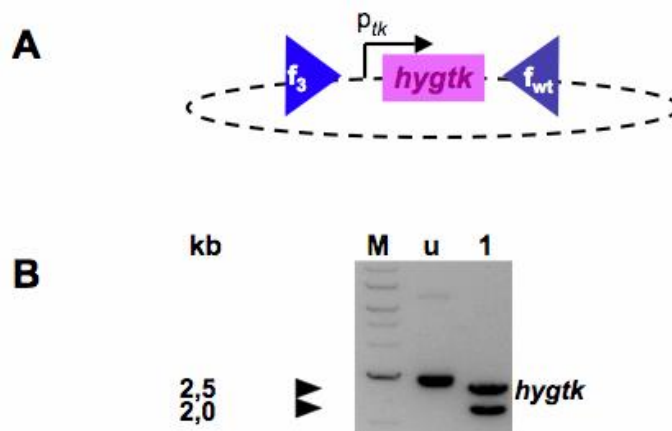


Abbildung 2-18: Austauschkonstrukt pExHygTk. A) Schematische Darstellung des Konstruktes pExHygTk. B) Das Austauschkonstrukt pExHygTk wurde zur Darstellung der klonierten Antikörperketten mit den Restriktionsendonukleasen *Ascl* und *NheI* analytisch verdaut, in einem 0,8%igen Agarose-Gel bei 100 V für 1 Std. aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. M=molekularer Größenstandard (DNA verschiedener doppelsträngiger Plasmide nach vollständigem Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen); u=unverdaute Vektor-DNA; 1=Verdau des Konstruktes mit *Ascl* und *NheI*. f_3 , f_{wt} =FRT-(„flippase-recognition-target“) Erkennungsstellen der Fip-Rekombinase; p_{tk} =HSV-Thymidin-Kinase Promotor; *hyg**tk*=Hygromycin-Thymidinkinase-Fusionsgen; kb=Kilobasen.

Die korrekte Klonierung des pExHygTk (Abbildung 2-18) wurde mittels Restriktionsverdau durch das Ausschneiden des eingebrachten *hyg**tk*-Fusionsgens über die Klonierungsschnittstellen *Ascl* und *NheI* und mittels Sequenzierung bestätigt. Die Funktionalität des klonierten *hyg**tk*-Fusionsgens wurde überprüft, indem CHO-DG44-Zellen mit 10 µg des Vektors pExHygTk per Elektroporation transfiziert wurden und das Medium nach 48 Std. mit Hygromycin B supplementiert wurde. Zunächst starb ein großer Teil der Zellpopulation ab, viele Klone zeigten sich jedoch resistent und proliferierten unter Hygromycin B.

2.6.2.2 RMCE II – Austausch der *hum.IgG1*-Antikörpergene gegen *hyg**tk*

Für zwei ausgewählte Subklone aus dem vorangegangenen RMCE sollte untersucht werden, ob ein weiterer Austausch der FRT-flankierten Expressionskassette mittels RMCE möglich war. Bei diesem Austausch sollten die *hum.IgG1*-Gene gegen das *hyg**tk*-Fusionsgen ausgetauscht werden. Dadurch sollten die Zellen die Fähigkeit zur *hum.IgG1*-Produktion verlieren, also keinen Antikörper mehr in den Zellkulturüberstand sekretieren, und somit im *hum.IgG1*-ELISA negativ sein. Des Weiteren vermittelt das *hyg**tk*-Fusionsgen eine Resistenz

gegenüber Hygromycin B. Beides konnte für die Selektion RMCE-positiver Klone genutzt werden.

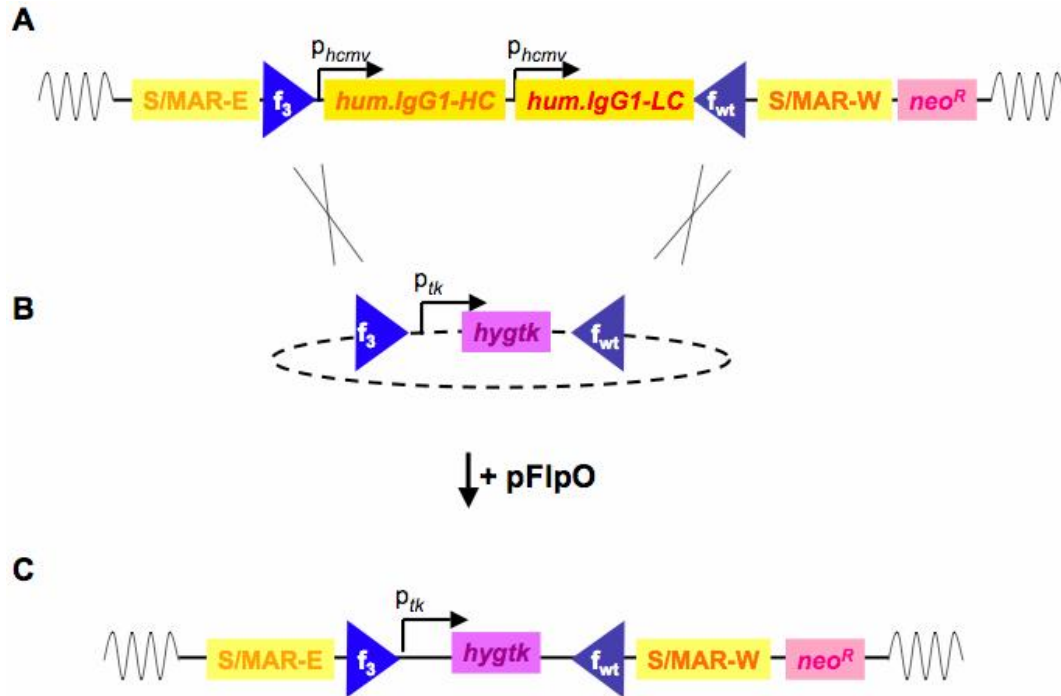


Abbildung 2-19: Schematische Darstellung des Flp-Rekombinase-vermittelten Kassettenaustauschs der *hum.IgG1*-Antikörpergene gegen *hygk*. (A) Das Selektionskonstrukt mit der über RMCE („recombinase-mediated cassette exchange“) austauschbaren Expressionskassette lag nach dem ersten RMCE (siehe 2.5) genomisch stabil integriert vor. (B) Es erfolgte eine Co-Transfektion des Austauschkonstrukts (pExHygTk) und des Flp-Rekombinase-Vektors (pFlpO-puro) im Verhältnis 3:1 mittels Lipofektion von ca. 3×10^5 Zellen. (C) Nach korrektem Flp-Rekombinase-vermitteltem Kassettenaustausch lag das *hygk*-Fusionsgen anstelle der *hum.IgG1*-Antikörper-Gene vor. S/MAR-E und S/MAR-W=Scaffold/Matrix-Attachment-Regions; f₃, f_{wt}=FRT („flippase-recognition-target“-)Erkennungsstellen der Flp-Rekombinase; Flp=pFlpO-puro; p_{hcmv}= humaner Zytomegalievirus-Promotor („Human cytomegalovirus IE1 promoter“); p_{tk}=HSV-Thymidin-Kinase Promotor; *hum.IgG1-HC*=Gen für die schwere Kette eines humanisierten IgG1-Antikörpers; *hum.IgG1-LC*=Gen für die leichte Kette eines humanisierten IgG1-Antikörpers; *hygk*=Hygromycin-Thymidinkinase-Fusionsgen; *neo^R*=Neomycin-Resistenzgen und pSV2-neo-Vektorsequenzen.

Begründet damit, dass im vorhergegangenen RMCE ein sichtbarer Effekt erst nach 12 Tagen aufgetreten war, wurde den Kulturen 14 Tage nach Co-Transfektion der Austausch- und Flp-Rekombinase-Konstrukte 100 µg/mL Hygromycin B zugegeben. Da der RMCE zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen sein sollte, wurde erwartet, dass die RMCE-

positiven Zellen Hygromycin B-resistent waren und RMCE-negative Zellen sterben würden. Es erfolgte eine Subklonierung mit einer Aussaatdichte von 0,5 Zellen pro Napf. Die Anwachsrate nach zwei Wochen lag bei 4 %. Die angewachsenen Subklone wurden in Sammelplatten überführt und nach einigen Tagen eine Überprüfung des Zellkulturüberstands auf hum.IgG1 im ELISA vorgenommen. hum.IgG1-negative Klone wurden expandiert und per PCR auf erfolgreichen Kassettenaustausch untersucht.

2.6.2.3 RMCE II - Analyse von Subklonen

Die Analyse der im ELISA als hum.IgG1-negativ identifizierten Klone auf erfolgreichen RMCE wurde mittels PCR durchgeführt. Im Falle eines Kassettenaustauschs waren aufgrund des Mehrkopien-Status der Ausgangsklone theoretisch mehrere genomische Konstellationen möglich (siehe Tabelle 2-3).

RMCE	Genkopien	Expressionsphänotypen	
		hum.IgG1	HygB-Resistenz
vollständig	>1	-	+
partiell	>1	+	+
-	≥1	+	+/-

Tabelle 2-3: Mögliche Expressionsphänotypen für Mischkulturen mit Mehrkopien-Status nach RMCE II. RMCE=“recombinase-mediated cassette exchange“; hum.IgG1=humanisierter IgG1-Antikörper; HygB-Resistenz=Resistenz gegen Hygromycin B, vermittelt durch das *hyg*tk-Fusionsgen.

Das Gen *neo*^R diente in dieser Analyse als interne Kontrolle für die Amplifizierbarkeit von Fragmenten, da es beim RMCE aufgrund seiner Positionierung außerhalb der *FRT*-flankierten RMCE-Kassette nicht ausgetauscht werden sollte. Daher sollten die durchgeführten PCR-Analysen in einer Amplifikation der *hyg*tk- und *neo*^R-Gene, nicht jedoch der *hum.IgG1*-Gene, resultieren.

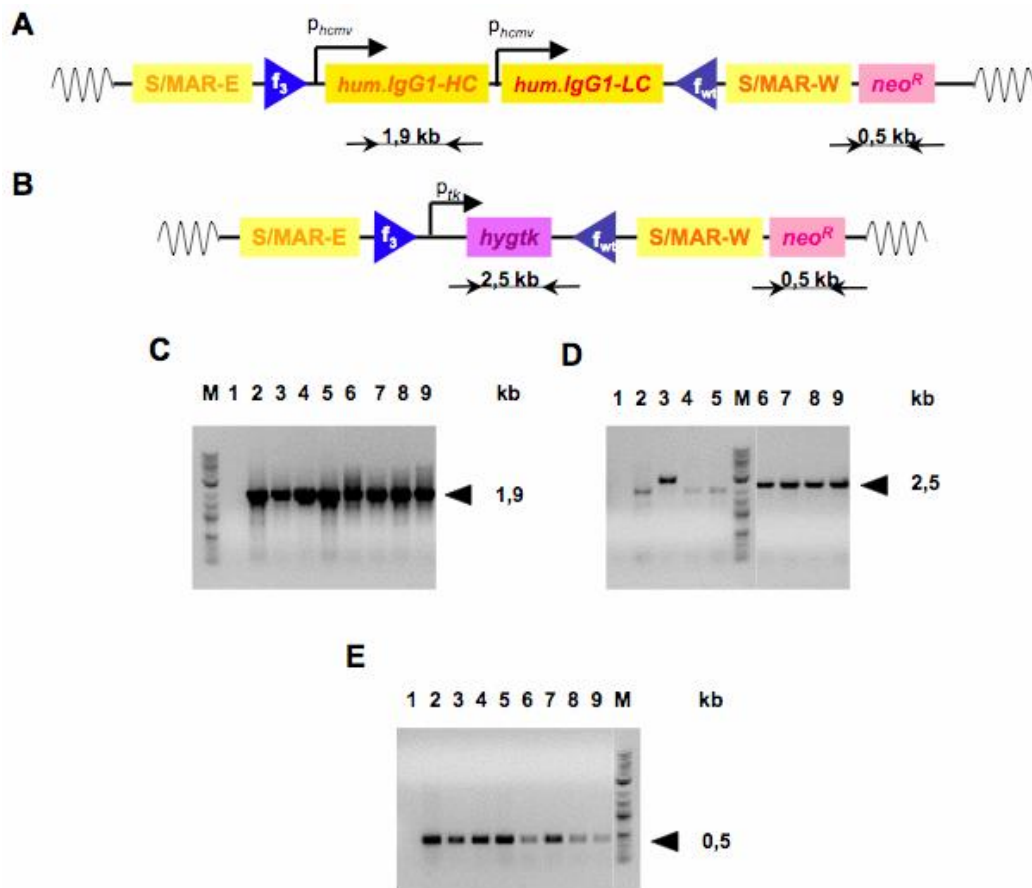


Abbildung 2-20: PCR auf genomischer DNA zur Bestätigung des RMCE II von *hum.IgG1* gegen *hygk*.

Schematische Darstellung der Expressionskassette vor (A) und nach (B) erfolgreichem RMCE mit den erwarteten Amplifikaten. Gezeigt sind die PCR-Amplifikate („polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion) des *hum.IgG1* bei 1,9 kb (C) und des *hygk* bei 2,5 kb (D) sowie des *neo^R*-Gens bei 0,5 kb (E) als interne Kontrolle. Die PCR-Proben wurden in einem 1%igen Agarose-Gel bei 100 V für 1 Std. aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. 1=Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne DNA-Matrize); 2= Positivkontrolle (entsprechender Vektor als Matrize); 3=Parentalklon 29.2D12.6G12; 4=Klon 29.2D12.7D8EFII.A11; 5=Klon 29.2D12.7D8EFII.F4; 6=Klon 29.2D12.7D8EFII.H6. M=molekularer Größenstandard (DNA verschiedener doppelsträngiger Plasmide nach vollständigem Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen); kb=Kilobasen; S/MAR-E und S/MAR-W=Scaffold/Matrix-Attachment-Regions; *f₃*, *f_w*=*FRT* („flippase-recognition-target“-Erkennungsstellen der Flp-Rekombinase; Flp=pFlpO-puro; *p_{hcmv}*= humaner Zytomegalievirus-Promotor („Human cytomegalovirus IE1 promoter“); *p_{tk}*=HSV-Thymidin-Kinase Promotor; *hum.IgG1-HC*=Gen für die schwere Kette eines humanisierten IgG1-Antikörpers; *hum.IgG1-LC*=Gen für die leichte Kette eines humanisierten IgG1-Antikörpers; *hygk*=Hygromycin-Thymidinkinase.

Die durchgeführten PCR-Analysen bewiesen, dass in diesem Experiment kein Klon identifiziert werden konnte, der erfolgreich einen wiederholten RMCE durchlaufen hat (siehe Abbildung 2-20). Einige Klone waren positiv für *hum.IgG1* und *hygk*. Eine Ursache dafür

könnte darin liegen, dass hier eine zufällige Integration der Antikörpergene ins Genom aufgetreten war und das Selektionskonstrukt noch intakt, aber eventuell mit reduzierter Kopienzahl, im Genom vorlag. Eine weitere und sehr wahrscheinliche Möglichkeit war jedoch, dass aufgrund der in Abbildung 2-16 dargestellten multiplen Transgen-Kopien nur ein partieller RMCE in den Zellen stattgefunden hatte, und sowohl die Expressionskassette vor (siehe Abbildung 2-20 A) als auch nach RMCE (siehe Abbildung 2-20 B) genomisch vorlagen. Die interne Kontrolle *neo^R* konnte auf allen genomischen Proben erfolgreich amplifiziert werden. Des Weiteren wurden auch Klone identifiziert, die *hum.IgG1*-positiv waren, genomisch jedoch kein nachweisbares *hygtrk*-Gen trugen. Da diese Klone jedoch unter antibiotischer Selektion generiert worden waren, war hier von einer spontanen Resistenz gegen Hygromycin B auszugehen. Ein vollständig erfolgreicher zweiter RMCE konnte also für die generierten 29.2D12-Subklone nicht erzielt werden. Es war jedoch aufgrund des Mehrkopien-Status der Ausgangskulturen anzunehmen, dass einige Klone zumindest partielle RMCE-Ereignisse aufwiesen, die aufgrund des phänotypischen Auswahlverfahrens nicht identifiziert werden konnten (siehe Tabelle 2-3).

2.7 Etablierung eines Anreicherungssystems für Antikörper-sezernierende CHO-Zellen mittels MACS[®]-Technologie – „Antibody CHO Capture System“

Die Identifikation von Zellen, bei denen in einem RMCE-Experiment das Fusionsgen *egfp-mhc* erfolgreich gegen *hum.IgG1*-Antikörpergene ausgetauscht werden konnte, erforderte einen sehr hohen Selektions-Aufwand, da aufgrund des Designs der Austausch-kassette keine Selektion auf RMCE positive Klone möglich war. Es war aber auch nicht möglich, die aus erfolgtem RMCE resultierenden EGFP-negativen Klone über durchflusszytometrische Sortierung anzureichern, da die Zellen beim Sortierungsprozess starben (2.2.2). Außerdem ist zu bedenken, dass EGFP-mHc als sezerniertes Produkt in Zellen, die zum Zeitpunkt der Messung nicht exprimierten, unter Umständen nicht messbar war. Ausgehend von der bekannten Firmen-internen Zellsortierungsmethode, die auf der magnetischen Separation Antikörper-markierter Einzelzellen basiert (MACS[®]-Technologie), sollte es möglich sein, humanisierte Antikörper-sezernierende Zellen von nicht sezernierenden Zellen mit Hilfe des „Antibody CHO Capture Systems“ zu separieren.

Die Strategie sah vor, CHO-Zellen mit einem anti-CHO.anti-hIgG-Konjugat (=Fangmatrix) zu markieren, auf das dann zu Etablierungszwecken extern hum.IgG1 gegeben wurde (Beladungstest), oder zur Zellanalyse und -separation durch Sekretion der Zellen („Antibody CHO Capture System“, siehe Abbildung 2-21) hum.IgG gebunden wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Detektion mit einem anti-hIgkappa.PE Konjugat mittels Durchflusszytometrie und im Falle des „Antibody CHO Capture System“ die Anreicherung über anti-PE Microbeads zur weiteren Kultivierung und Analyse der Fraktionen.

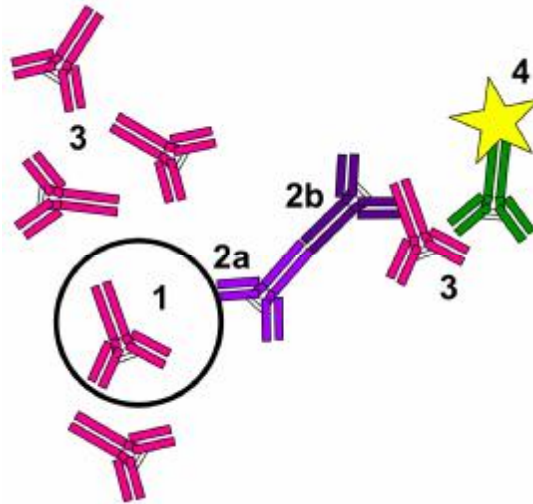


Abbildung 2-21: Schematische Darstellung des „Antibody CHO Capture Systems“. Eine CHO-Zelle, die rekombinante humane (hIgG) oder humanisierte (hum.IgG) Antikörper sezerniert (1), wird mit der Fangmatrix beladen, die sich aus einem Anker-Antikörper (anti-CHO-Antikörper, 2a) und einem Fang-Antikörper (anti-hIgG, 2b) zusammensetzt. Darauf bindet der von der Zelle sezernierte Antikörper (3), der im nächsten Schritt über ein Fluorochrom-gekoppeltes Detektionskonjugat (4) nachgewiesen werden kann. CHO=Chinesische Hamster-Ovar Zelle, anti-hIgG=Antikörper mit Spezifität gegen humane oder humanisierte IgG-Moleküle.

Erste Versuche zur Auswahl der dazu geeigneten Antikörper wurden im Rahmen eines Praktikums von Simone Meidhof durchgeführt und die dabei gewonnenen Erkenntnisse für die im Folgenden dargestellten Versuche verwendet.

2.7.1 Identifikation geeigneter anti-CHO-Antikörper

Zur Etablierung eines „Antibody CHO Capture Systems“ musste zunächst ein anti-CHO-Antikörper generiert werden, der eine hochaffine und spezifische Bindung auf CHO-Zellen zeigte. Diese Antikörpergenerierung erfolgte durch die intraperitoneale Hyperimmunisierung

von Mäusen mit serumfreien CHO-DG44-Zellen (Invitrogen), Fusion mit SP2/0-Myelomzellen und anschließende Analyse der Zellkulturüberstände auf spezifische Antikörper (Helene Altmann, Miltenyi Biotec GmbH). Acht Hybridom-Klone wurden identifiziert, die spezifische anti-CHO-Antikörper sezernierten. Diese Antikörper wurden im Folgenden auf ihre Affinität getestet. Dabei wurden CHO-DG44-Zellen mit den aufgereinigten Antikörpern inkubiert und diese dann über die anti-Isotyp-Antikörper ramlgG1.Phycoerythrin bzw. ramlgG2b.Phycoerythrin detektiert.

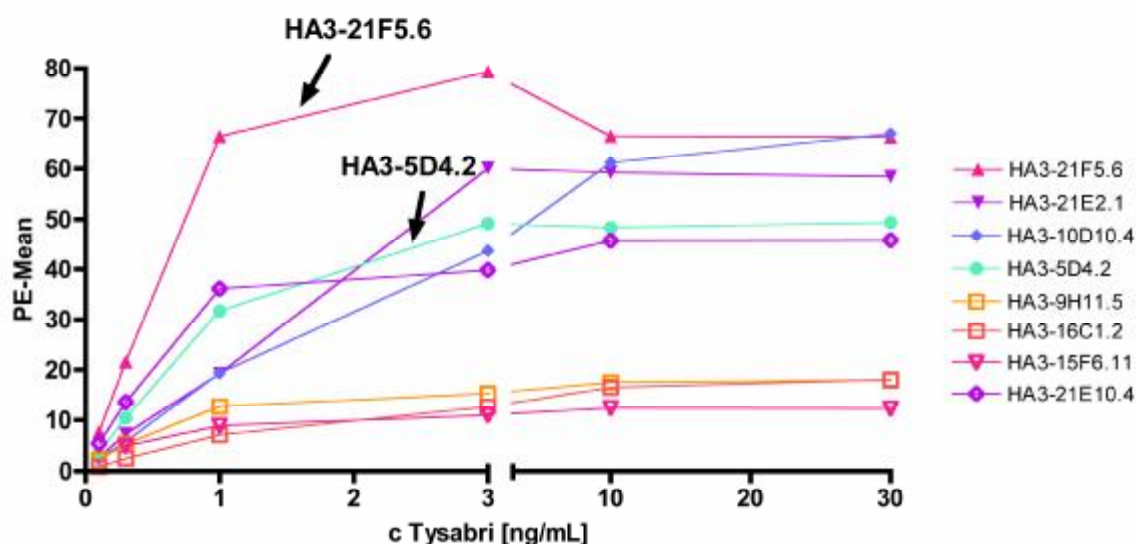


Abbildung 2-22: Titration von anti-CHO-Antikörpern auf CHO-Zellen zur Identifikation eines geeigneten Anker-Antikörpers für die Fangmatrix. CHO-DG44-Zellen wurden mit den zu testenden anti-CHO-Antikörpern in verschiedenen Konzentrationen (0,3-30 ng/mL) in 100 µL inkubiert, mit den anti-Isotyp-Antikörpern (ramlgG1.PE für HA3-5D4.2, HA3-9H11.5, HA3-16C1.2, HA3-15F6.11 und HA3-21E10.4 bzw. ramlgG2b.PE für HA3-21F5.6, HA3-21E2.1 und HA3-10D10.4) gefärbt, erneut gewaschen und die Proben im MACSQuant durchflusszytometrisch analysiert. c=Konzentration; PE-Mean=mittleres Phycoerythin-Signal in der durchflusszytometrischen Analyse; ng/mL=Nanogramm/Milliliter; µL=Mikroliter.

Die in Abbildung 2-22 dargestellte Färbung von CHO-DG44-Zellen mit den anti-CHO-Antikörpern macht deutlich, dass die Klone HA3-21F5.6 und HA3-4D4.2 jeweils die höchste Affinität und eine vergleichsweise gute Helligkeit zeigten, wobei Klon HA3-21F5.6 insgesamt mit einem mittleren PE-Wert von ca. 60 deutlich heller war, als HA3-5D4.2 mit einem Wert von 50. Zu beachten war hierbei, dass die Färbungen aufgrund unterschiedlicher verwendeter PE-Konjugate nicht direkt miteinander verglichen werden konnten. Für weitere Versuche wurden Fangmatrices hergestellt: die beiden anti-CHO-Antikörper wurden mit dem

anti-hIgG-Antikörper verkoppelt, um sie in Hinblick auf ihre Nutzbarkeit für die Immobilisierung von Antikörpern auf der Zelloberfläche zu testen.

2.7.2 Herstellung eines Kontroll-Konjugates

Um die Beladung der CHO-DG44-Zellen mit der Fangmatrix ohne die Färbung ihrer Einzelkomponenten mit Isotyp-Antikörpern etablieren zu können, und eine Kontrolle für die Bindung von *hum.IgG*-Antikörpern durch die Fangmatrix zu erhalten, wurde ein Kontroll-Konjugat aus dem therapeutischen humanisierten IgG4-Antikörper Tysabri® (=Natalizumab) und R-Phycoerythrin (PE) hergestellt. Das Konjugat wurde vom anti-hIgG-Teil der Fangmatrix spezifisch erkannt und gebunden. Dadurch waren die so behandelten Zellen im PE-Kanal des Durchflusscytometers detektierbar (Abbildung 2-23).

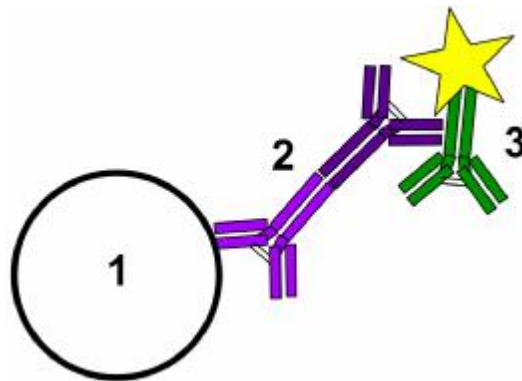


Abbildung 2-23: Schematische Darstellung der Beladungskontrolle Tysabri.PE. Untransfizierte CHO-DG44-Zellen (1) wurden mit Fangmatrix (2) inkubiert und anschließend mit dem Kontrollkonjugat Tysabri.PE (3) beladen. Diese Versuchsanordnung wurde einerseits verwendet, um einen optimalen Titer für die Fangmatrix festzustellen und diente andererseits als Positivkontrolle für die folgenden Versuche. CHO=Chinesische Hamster-Ovar Zelle.

Die Kopplung des Tysabri.PE wurde durch Reduktion des Antikörpers mit DTT und Aktivierung des R-Phycoerythrin mit SMCC im molaren Verhältnis von 1:2 durchgeführt. Das entstandene Konjugatgemisch wurde anschließend über eine Superdex 200 Säule größenfraktioniert und auf mit Fangmatrix beladenen CHO-DG44-Zellen titriert (Abbildung 2-24).

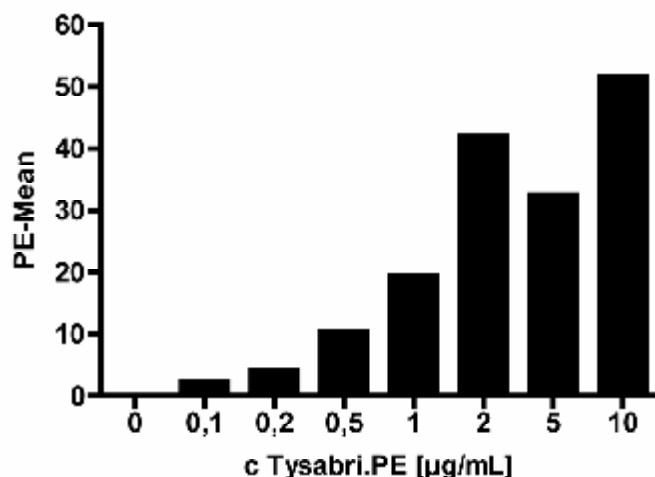


Abbildung 2-24: Bestimmung des optimalen Färbetitors für die Beladungskontrolle Tysabri.PE auf Fangmatrix-beladenen CHO-DG44-Zellen. Die Zellen wurden mit 10 µg/mL Fangmatrix in 100 µL für 10 Min. auf Eis inkubiert und gewaschen. Im nächsten Schritt wurde mit verschiedenen Konzentrationen des Tysabri.PE-Konjugates in 100 µL gefärbt, erneut gewaschen und die Probe im MACSQuant durchflusszytometrisch analysiert. PE-Mean=mittleres Phycoerythin-Signal in der durchflusszytometrischen Analyse; c=Konzentration; µg/mL=Mikrogramm/Milliliter.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die Färbung mit 0,1-0,5 µg/mL Tysabri.PE einen mittleren PE-Wert unter 10 ergab. Die Färbung mit einer Konzentration von 1 µg/mL ergab einen mittleren PE-Wert von 20 und ab einer Färbekonzentration von 2 µg/mL lag die Färbung in diesem Experiment über einem mittleren PE-Wert von 30. Für die weitere Verwendung des Tysabri.PE wurde eine Konzentration von 3 µg/mL ausgewählt, da diese im Bereich der Sättigung zu liegen scheint.

2.7.3 Analyse der Funktionalität der Fangmatrix

Unter Verwendung der zuvor etablierten Kontrolle Tysabri.PE (2.7.2) wurde im Folgenden analysiert, welche die optimale Konzentration der Fangmatrix zur Beladung der Zellen war.

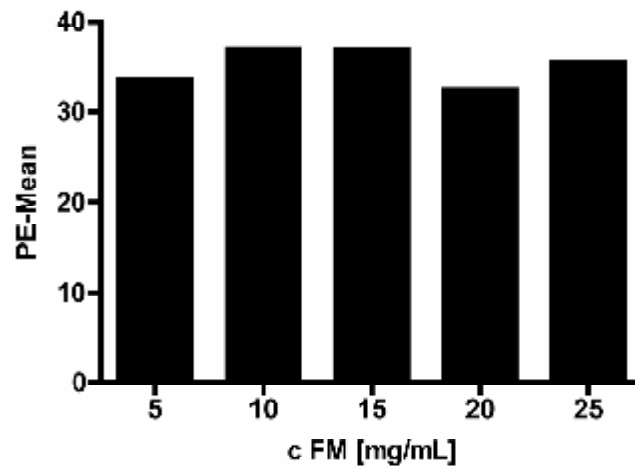


Abbildung 2-25: Bestimmung der optimalen Fangmatrix-Konzentration (c FM) auf CHO-DG44-Zellen bei Beladung mit Tysabri.PE. CHO-DG44-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an Fangmatrix in 100 μ L für 10 Min. auf Eis inkubiert und gewaschen. Anschließend wurde mit 3 μ g/mL Kontrollkonjugat Tysabri.PE in 100 μ L gefärbt, erneut gewaschen und die Probe im MACSQuant durchflusszytometrisch analysiert. PE-Mean=mittleres Phycoerythin-Signal in der durchflusszytometrischen Analyse; c=Konzentration; mg/mL=Milligramm/Milliliter.

Die Titration in Abbildung 2-25 zeigt eindeutig, dass schon eine Konzentration von 5 μ g/mL Fangmatrix bei Beladung mit Tysabri.PE ein starkes PE-Signal mit einem mittleren Wert von über 30 erzielte und dieses Signal auch bei den getesteten höheren Konzentrationen nicht heller wurde. Daher wurde eine Färbekonzentration von 7,5 μ g/mL für die Fangmatrix festgelegt.

Das „Antibody CHO Capture System“ sollte nicht nur für die Analyse und Anreicherung von hum.IgG4-Produzenten genutzt werden, sondern möglichst auch für die Produzentenanreicherung verschiedener humaner und humanisierter Immunglobuline anwendbar sein. Dementsprechend sollte die Fangmatrix auch bei einer Beladung mit diesen Proteinen und der Detektion mit einem IgG-spezifischen Antikörper-PE-Konjugat eine Färbung ergeben. Es wurde daher ein Beladungstest durchgeführt (Abbildung 2-28), bei dem verschiedene Immunglobuline extern auf die mit Fangmatrix markierten Zellen gegeben und mit dem Detektionsantikörper nachgewiesen wurden.

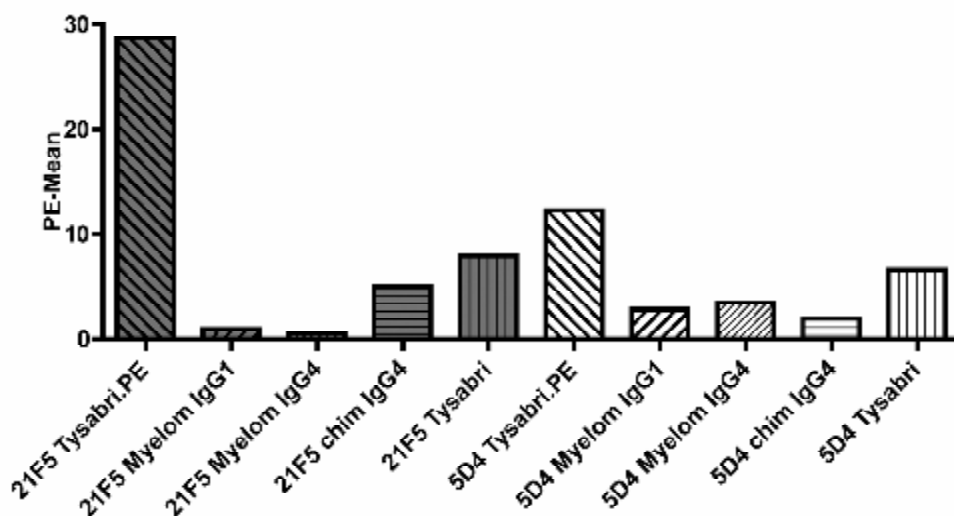


Abbildung 2-26: Analyse der Funktionalität der Fangmatrix für die Detektion verschiedener humaner Immunglobuline auf CHO-DG44-Zellen. CHO-DG44-Zellen wurden mit Fangmatrix inkubiert, anschließend mit verschiedenen humanen Immunglobulinen beladen, mit einem anti-human-IgG.PE-Konjugat detektiert und im MACSQuant durchflusszytometrisch analysiert. Die Beladungen beider getesteter Fangmatrices mit Tysabri.PE dienten als Positivkontrollen. 21F5, 5D4=Fangmatrices, die auf unterschiedlichen anti-CHO-Antikörpern basieren; Tysabri.PE=Kontrollkonjugat; Myelom IgG1=humanes IgG1-Myelomprotein; Myelom IgG4=humanes IgG4-Myelomprotein; chim IgG4=chimärer IgG4 Antikörper; PE-Mean=mittleres Phycoerythin-Signal in der durchflusszytometrischen Analyse.

Es wurde deutlich, dass in diesem Versuch die Beladung mit der Kontrolle Tysabri.PE insgesamt höhere mittlere PE-Werte ergab als die Beladung mit einem der getesteten Proteine (inklusive Tysabri) und einem zusätzlichen Detektionsantikörper. Des Weiteren zeigten sich die humanen Myelomproteine IgG1 und IgG4 auf beiden getesteten Fangmatrices als kaum detektierbar. Chimärer IgG4 wurde in beiden Ansätzen detektiert, jedoch mit höheren mittleren PE-Werten bei Beladung mit der HA3-21F5.6-Fangmatrix. Die insgesamt besten Helligkeiten zeigte die Beladung mit Tysabri, die jedoch in keiner Weise vergleichbar war mit dem Signal der Kontrolle Tysabri.PE.

2.7.4 Identifikation eines geeigneten Detektionsantikörpers

Neben der optimalen Konzentration der Fangmatrix musste ein Detektionskonjugat gefunden werden, mit dem eine gute Helligkeit der Färbung zu erreichen war. Deshalb wurden

verschiedene Detektionsantikörper mit optimierten Titern für die Färbung von Tysabri-beladener Fangmatrix eingesetzt. Als Kontrolle diente wieder die direkte Färbung der Fangmatrix mit Tysabri.PE.

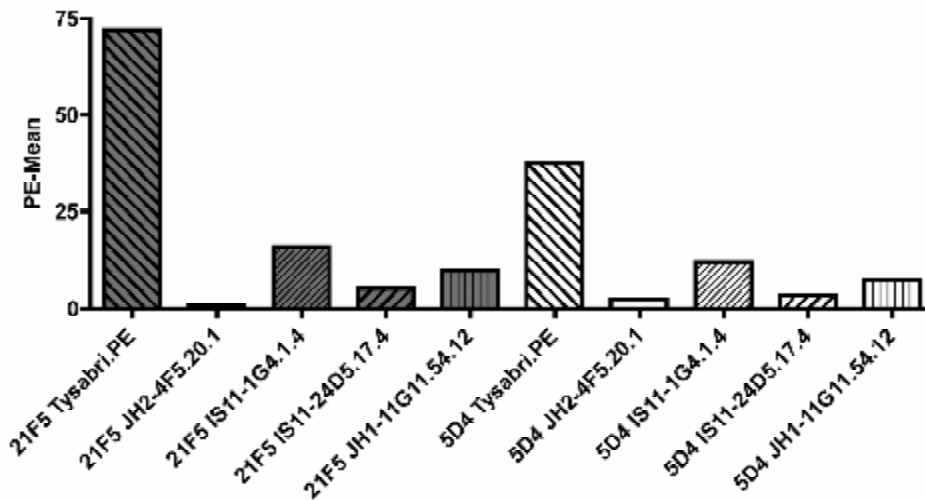


Abbildung 2-27: Identifikation eines geeigneten Detektionsantikörpers im Beladungstest. Die CHO-DG44-Zellen wurden nach Inkubation mit der Fangmatrix und Tysabri mit verschiedenen Detektionskonjugaten im Standardtiter gefärbt und im MACSQuant durchflusszytometrisch analysiert. Die beiden linken Balken zeigen die Kontrollen (Tysabri.PE-Beladung auf den Fangmatrices). 21F5, 5D4=Fangmatrices, die auf unterschiedlichen anti-CHO-Antikörpern basieren; Tysabri.PE=Kontrollkonjugat; PE-Mean=mittleres Phycoerythin-Signal in der durchflusszytometrischen Analyse.

Der Versuch (Abbildung 2-27) ergab, dass IS11-1G4.1.4 für beide getestete Fangmatrices die höchsten mittleren PE-Werte ergab (zwischen 10 und 20). Im Vergleich zur Beladungskontrolle Tysabri.PE mit Signalen um 40 und 70 waren diese jedoch insgesamt schwach. In weiteren, nicht gezeigten Färbungen, waren die mit diesem Konjugat erzielten Signale jedoch insgesamt deutlich höher. Daher wurde das Konjugat IS11-1G4.1.4 zur Detektion ausgewählt.

2.7.5 Titration der Beladung der Fangmatrix

Das System sollte zur Anreicherung von Produzentenklonen aus Mischkulturen verwendet werden. Entscheidend dafür war, herauszufinden, ob die Sensitivität des „Antibody CHO Capture System“ für eine solche Anwendung überhaupt ausreichend war. Zu diesem Zweck wurde ein Beladungsversuch durchgeführt (Abbildung 2-28), der zeigen sollte, in welcher

Tysabri-Konzentration noch eine Färbung der Zellen möglich war. Dieser Versuch konnte nicht unter Verwendung der Tysabri.PE-Kontrolle durchgeführt werden, da diese schon in den vorher durchgeführten Versuchen immer weitaus höhere Färbungen erzielte als die Beladungen mit Antikörpern und damit falsche Rückschlüsse auf die Sensitivität des Systems zulassen würde.

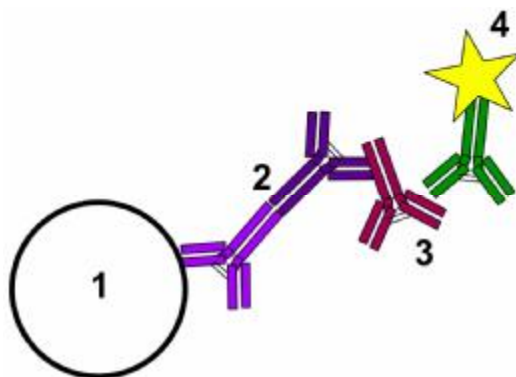


Abbildung 2-28: Schematische Darstellung des Beladungstests auf CHO-DG44-Zellen. Die untransfizierten, nicht-Antikörper-sezernierenden CHO-Zellen (1) wurden zunächst mit der Fangmatrix (2), und im Anschluss daran mit unterschiedlichen Mengen Beladungsprotein (Tysabri, 3) inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte dann die Detektion über anti-Igkappa.PE (4).

Im ersten Versuch wurden Tysabri-Konzentrationen von 1 ng/mL bis 10 µg/mL getestet.

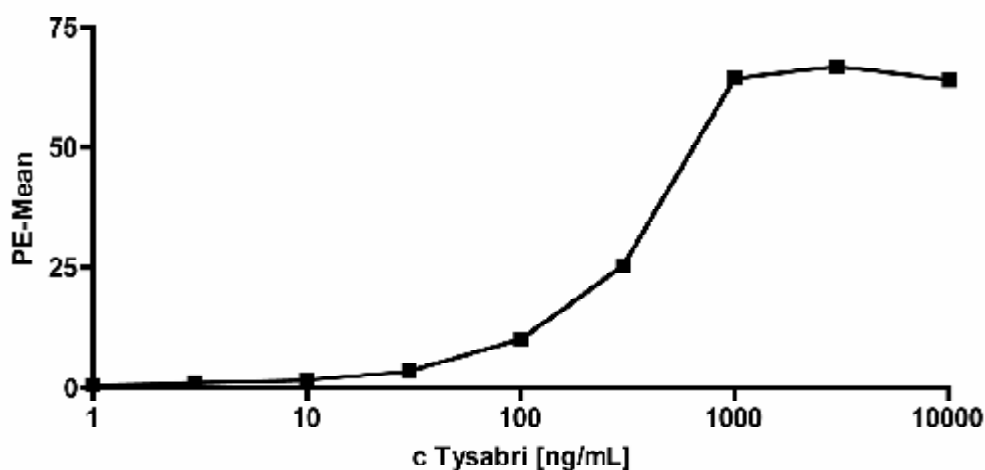


Abbildung 2-29: Bestimmung von Sensitivität und maximaler Beladung der Fangmatrix mit Tysabri im Bereich von 1 bis 10.000 ng/mL. CHO-DG44-Zellen wurden mit Fangmatrix inkubiert, mit verschiedenen Mengen Tysabri beladen, mit IS11-1G4.1.4.PE detektiert und im MACSQuant durchflusszytometrisch analysiert.

Tysabri.PE=Kontrollkonjugat; PE-Mean=mittleres Phycoerythin-Signal in der durchflusszytometrischen Analyse.
c=Konzentration; ng/mL=Nanogramm/Milliliter.

Die Sättigung der Beladung wurde im Bereich von 300 bis 1.000 ng/mL mit mittleren PE-Werten von bis zu 65 erreicht. Die minimale Färbekonzentration lag zwischen 10 und 100 ng/mL mit einem PE-Signal von 1,6 bis 3 (Abbildung 2-29). Die Titration wurde zur genaueren Bestimmung dieser Werte für den Konzentrationsbereich von 50 bis 1.000 ng/mL wiederholt (Abbildung 2-30).

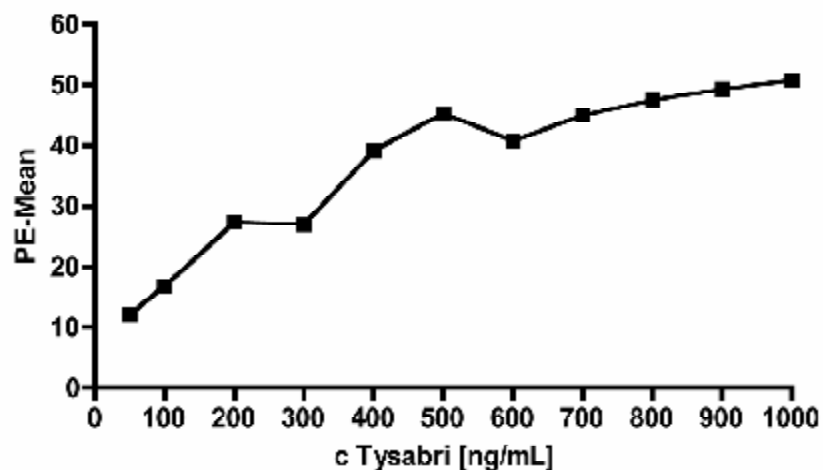


Abbildung 2-30: Bestimmung von Sensitivität und maximaler Beladung der Fangmatrix mit Tysabri im Bereich von 50 bis 1.000 ng/mL. CHO-DG44-Zellen wurden mit Fangmatrix inkubiert, mit verschiedenen Mengen Tysabri beladen, mit IS11-1G4.1.4.PE detektiert und im MACSQuant durchflusszytometrisch analysiert. Tysabri.PE=Kontrollkonjugat; PE-Mean=mittleres Phycoerythin-Signal in der durchflusszytometrischen Analyse. c=Konzentration; ng/mL=Nanogramm/Milliliter.

Die Sättigung der Beladung wurde mit einem mittleren PE-Wert von 45 ungefähr ab 500 ng/mL erreicht. Die niedrigste getestete Konzentration von 50 ng/mL ergab mit einem mittleren PE-Wert von 12 noch ein deutliches Signal und wies auf eine gute und ausreichende Sensitivität des Systems hin.

2.7.6 „Antibody CHO Capture System“ zur Detektion und Anreicherung von Produzentenzellen

In den vorangegangenen Versuchen konnten alle für das „Antibody CHO Capture System“ benötigten Komponenten identifiziert und ihre optimalen Konzentrationen bestimmt werden. Der Aufbau des „Antibody CHO Capture System“ erwies sich unter Verwendung des zum Färbeansatz zugegebenen hum.IgG-Antikörpers als funktionell. Der nächste Schritt war nun der Nachweis von hum.IgG, welcher von stabil transfizierten CHO-Produzentenzellen sezerniert wurde. Verwendet wurde hier der mittels RMCE etablierte Klon 29.2D12-6H4, da er von allen etablierten Klonen die höchste spezifische Produktionsrate zeigte (siehe 2.6.1).

Die Färbung von 1×10^7 Zellen wurde, unter Berücksichtigung der Kontrollen, durchgeführt und die Separation der entsprechenden Proben mittels MACS®-System vorgenommen. Alle Fraktionen der Separation wurden in einer durchflusszytometrischen Messung analysiert, um eine Anreicherung von Antikörper-sezernierenden Zellen zeigen zu können.

Es wurde festgestellt, dass es im Rahmen des Versuchs nicht möglich war, Antikörper-Produzenten erfolgreich aus dem Zellgemisch anzureichern. Generell war keine Detektion des sezernierten Antikörpers möglich (Daten nicht gezeigt). Es wurde beobachtet, dass die Proben, die nach dem Protokoll prozessiert wurden, eine deutlich reduzierte Vitalität besaßen. Neben diesem Absterben der Zellen während des Versuchs kann zusätzlich vermutet werden, dass mit 1,5 pcd die Menge des sezernierten Antikörpers auch der besten Produzenten der Kultur nicht ausreichte, um eine Färbung im „Antibody CHO Capture System“ und damit eine Anreicherung erzielen zu können.

Für CHO-DG44-Transfektanten, die aus einer Transfektion mit einem dualen Vektorsystem zur Antikörper-Expression mit anschließender MTX-Genamplifikation hervorgegangen waren und mit maximal 35 pcd weitaus höhere spezifische Produktionsrate besaßen, konnte inzwischen jedoch eine Anreicherung von Produzenten-Zellen gezeigt und mittels intrazellulärer Färbung der Separations-Fraktionen bewiesen werden (persönliche Kommunikation mit Susanne Höher-Peters, Miltenyi Biotec GmbH). Dies legt nahe, zukünftig weitere Optimierungen bezüglich der Sensitivität des „Antibody CHO Capture System“ vorzunehmen, um Hochproduzenten anreichern zu können, die gleichzeitig eine sehr effiziente Sekretion des Zielproteins gewährleisten.

3 Diskussion

3.1 Auswahl einer geeigneten Expressionszelllinie

Der Großteil der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie produziert biologische Wirkstoffe unter Verwendung von rekombinanten stabilen Zelllinien. Kritische Parameter für eine lohnende Produktion stellen Expressionsniveaus und Zelldichten dar, wobei Zelllinien mit spezifischen Produktivitäten von mindestens 20 pcd und Zelldichten von 1×10^6 bis $1 \times 10^7/\text{mL}$ für die kommerzielle Anwendung interessant sind (Clarke und Compton, 2008; Wurm, 2004). Zudem ist die Stabilität der Zelllinien essentiell für Prozesskonsistenz, Produktqualität und -Reinheit. Die grundlegendste Entscheidung, die im Entwicklungsprozess einer Produktionszelllinie getroffen werden muss, ist die Wahl der Wirtszelle und des Expressionssystem mit Vektorsystem und Selektionsmechanismus. Entsprechend den Anforderungen an das Produkt muss die Zelllinie neben der nötigen Produktionskapazität in Aspekten wie posttranslationaler Prozessierung, Aminosäure-Modifikation, Glykosylierung und proteolytischer Spaltung geeignet sein und den regulatorischen Anforderungen entsprechen (Wurm, 2004). Mammalische Zelllinien kommen diesen Anforderungen am ehesten nach (Jenkins und Curling, 1994). Besonders bevorzugt werden heute CHO-Zellen und die murinen Myelomzelllinien NS0 und SP2/0 eingesetzt (Wurm, 2004). CHO-Zellen besitzen einige Vorteile: Wachstumscharakteristika, Metabolismus, Verhalten im Bioreaktor und virulente Faktoren sind gut verstanden, und die Zellen haben eine starke regulatorische Akzeptanz, sind also zur Proteinproduktion anerkannt (Jones *et al.*, 2007). CHO-Zelllinien sind außerdem kompatibel mit Gen-Amplifikationsmechanismen. Trotz einer endogenen Glutaminsynthetase-Expression kann durch Applikation des GS-Inhibitors MSX (Methionin-Sulphoximin) das GS-Amplifikationssystem (Barnes *et al.*, 2000) angewendet werden. Eine Amplifikation über das DHFR-System (Alt *et al.*, 1978) ist ebenfalls möglich, da CHO-Dukx-B11- und CHO-DG44-Zelllinien mit entsprechenden Defizienzen verfügbar sind.

Ein weiterer, für die kommerzielle Produktion wichtiger Aspekt ist die Möglichkeit zur proteinfreien Suspensionskultur. Zelllinien, die unter serumfreien Bedingungen transfiziert und selektioniert werden können, sind aus regulatorischen Gründen zu bevorzugen. Auch zeitlich betrachtet ist dies von Vorteil, da sich die proteinfreie Adaption mit möglichen Einbrüchen von 35 bis 70 % negativ auf die Produktivität und Expressionsstabilität auswirkt, und so weitere Analysen erforderlich sind (Lattenmayer *et al.*, 2007). Tierische Komponenten

und vor allem Serum wirken sich zwar positiv auf die Produktivität und das Wachstum aus, sind aber aus unterschiedlichsten Gründen problematisch: Die genaue Zusammensetzung von Serum ist nicht bekannt und konstant, wodurch Versuchsergebnisse oft nicht aussagekräftig und vergleichbar sind. Durch Zugabe von Serum besteht zusätzlich ein erhöhtes Kontaminationsrisiko und besonders die potentielle Verunreinigung mit TSE-Agenzien („transmissible spongiform encephalopathy“) ist kritisch. Die Parameter unterliegen daher strengen offiziellen Richtlinien (Atkins *et al.*, 2007). Einige Risiken, die mit der Verwendung von Serum einhergehen, lassen sich durch die Nutzung von zertifiziertem Serum umgehen, welches den Bestimmungen der FDA (Code of Federal Regulation (9CFR), §113.28,47,53), der EMEA (EMA Guideline 1793/02 und 743/00) und der Europäischen Pharmacopoeia (European Pharmacopoeia Monograph of Bovine Serum 5.4 (04/2006:2262)) entspricht. Dies wirkt sich allerdings aufgrund hoher Kosten nachteilig auf die Wirtschaftlichkeit der Produktionsprozesse aus. Die Etablierung von robusten, serum-unabhängigen Zelllinien in eigens dafür entwickelten, optimierten und chemisch definierten Kulturmedien ist daher die bevorzugte Vorgehensweise (persönliche Kommunikation mit Dr. Hitto Kaufmann, Boehringer Ingelheim).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst analysiert, welche Zelllinien für die Etablierung der Produktionszelllinie verwendet werden konnten (2.2). Dabei wurde deutlich, dass sich die serumfreien CHO-DG44-, CHO-K1- und CHO-Dukx-B11-Zellen per Endpunktverdünnung nicht effizient subklonieren ließen (2.2.3). Des Weiteren zeigte sich in Southern Blot Analysen zur Kopienzahlbestimmung und in durchflusszytometrischen Analysen (Daten nicht gezeigt), dass die generierten Subklone trotz dreifacher Endpunktverdünnung scheinbar Mischpopulationen darstellten. Dies lag in den teilweise extremen Aggregationen der Zellen begründet, die sich weder durch mechanische noch durch chemische Einwirkung entfernen ließen. Eine Subklonierung der serumfreien CHO-Zellen mit höheren Effizienzen ist laut Kim *et al.* (2001) jedoch unter Verwendung von alpha-MEM Zellkulturmedium mit supplementiertem FCS möglich. In diesem Fall ist aufgrund der bereits diskutierten regulatorischen Anforderungen für die Produktion eine serumfreie Adaption nötig, wobei wie vorher erwähnt, Variationen bezüglich Produktivitäten und Wachstumseigenschaften der Zelllinie berücksichtigt werden müssen (Lattenmayer *et al.*, 2007). Als Alternative zur konventionellen Subklonierung per Endpunktverdünnung und zur Sicherstellung der Klonalität wurde die Möglichkeit der FACS-Sortierung für die bevorzugten, serumfrei kultivierten CHO-DG44-Zellen im Vergleich zu den serumabhängigen CHO-DG44-Zellen getestet. Wie sich zeigte, war diese für die serumfreien Zellen sowohl in Kulturmedium mit supplementiertem FCS (Abbildung 1-1 A) als auch unter Verwendung von konditioniertem Medium und FCS (Abbildung 1-1B) nicht möglich, da die Zellen beim Sortierungsprozess starben (2.2).

Da die Aufgabenstellung dieser Arbeit keine Zelllinienoptimierung umfasste, wurde entschieden, die Supplementierung mit nach den bereits erwähnten Richtlinien von FDA, EMEA und Pharmacopoeia zertifiziertem Serum für die Machbarkeitsstudie zuzulassen. Die Versuche wurden daher unter Verwendung von serumabhängigen CHO-DG44-Zellen durchgeführt, die sich in Vorversuchen als weitaus robuster dargestellt haben, als die getesteten serumunabhängigen Kulturen (2.2.2). Um im Falle eines Erfolges möglichst nah an einem zulassungsfähigen Produkt zu arbeiten, wurde jedoch entschieden, für die Kultivierung der serumabhängigen Zelllinien entsprechend den Richtlinien zertifiziertes FCS zu supplementieren. Die Möglichkeit der nachträglichen Adaption der Zelllinie an serumfreies Medium war gegeben, die Vorhersage der spezifischen Produktivität und des Wachstumsverhaltens nach Adaption jedoch wie erläutert ungewiss.

3.2 Was zeichnet die optimale genomische Lokation zur Gen-Expression aus?

Die zentralen Fragen, die jeder Zelllinienentwicklung zu Grunde liegen, sind heute immer noch: Was macht den optimalen Gen-Ort für das Transgen aus? Mit welcher Methode kann man ihn identifizieren? Und: Wie kann man ihn mit maximalem Effekt optimieren? Ihre Beantwortung würde aufklären, welche Strategien nötig oder möglich sind, um mit geringem analytischen Aufwand Zelllinien mit hohen spezifischen Produktivitäten zu generieren. Ob diese Fragen überhaupt abschließend geklärt werden können, ist ungewiss, da die Regulation der Gen-Expression und Sekretion auf mehreren Ebenen stattfindet und eine immense Komplexität besitzt. Der Grad des Einflusses, den der Gen-Ort auf das eingebrachte Transgen hat, erschwert die Vorhersage zusätzlich.

So lange die Fragen nach der optimalen genomischen Lokation nicht geklärt werden können, werfen sie viele mögliche Strategien auf, die hier teilweise schon angesprochen wurden. Dennoch scheint es sinnvoll, sie in Hinblick auf die hier verwendeten Ansätze erneut zu diskutieren.

Wird die Entscheidung dahingehend gefällt, zur Vermeidung von epigenetischen Effekten eine Gen-Kopienzahl-unabhängige Strategie zu verfolgen, die zudem die Generierung einer isogenen Basiszelllinie ermöglicht, muss eine grundlegende Wahl getroffen werden: Soll eine empirische oder rationale Herangehensweise zur Identifikation eines geeigneten Gen-Orts verfolgt werden?

Die Generierung von Hoch-Produzenten-Zelllinien auf dem empirischen Weg wurde bereits ausführlich beschrieben (siehe 1.2). Die auf diesem Weg einmal identifizierten geeigneten genomischen Positionen werden der mehrfachen Nutzung zugänglich, indem sie durch flankierende heterospezifische *FRT*-Erkennungsstellen zum Austausch des GOI per RMCE angesteuert werden können (Bode *et al.*, 2000b; Schlake und Bode, 1994). Das Auftreten eines zur Expression geeigneten Gen-Orts korreliert allerdings nicht zwangsläufig mit einer RMCE-Kompatibilität (Vooijs *et al.*, 2001), was zu einem erhöhten Selektionsaufwand führt (Qiao *et al.*, 2009). Verbesserungen der genomischen Lokation durch Chromatin-Elemente bringen weitere Expressions-steigernde Effekte (siehe 1.3). Der Nutzen des Systems im Vergleich zum konventionellen Weg ist hauptsächlich dadurch gegeben, dass eine generierte Expressionszelllinie in Hinblick auf Zulassung zum Produktionsverfahren nur einmalig aufwendig charakterisiert werden muss.

Eine Alternative stellt ein rationaler Ansatz zur Identifikation eines geeigneten Gen-Orts dar. Daten aus Microarray- und Proteom-Analysen könnten herangezogen werden, um interessante genomische Positionen zu identifizieren. Denkbar wäre hierbei zum Beispiel, dass die Gen-Orte bestimmter konstitutiv exprimierter Haushalts- („housekeeping“-) Gene wie GAPDH, ribosomaler Proteine, Ubiquitin usw., sehr effizient und stabil abgelesen werden. Eine Integration des GOI in eine solche genomische Lokation könnte große Vorteile mit sich bringen, besonders, wenn auch hier zusätzlich Expressions-fördernde Elemente wie S/MAR-Sequenzen eingebracht werden, die allerdings nur im Falle von Einzelkopie-Integraten einen solchen Effekt zeigen (Bode *et al.*, 2003b). Möglich wäre die dazu nötige gezielte genomische Integration über homologe Rekombination. Hier bestünde auch die Möglichkeit einer Kombination mit dem RMCE-System durch die Positionierung von *FRT*-Erkennungsstellen im integrierten Fragment, wie es auch von Oumard *et al.* vorgeschlagen wurde (2006). Den Nachteil dieses Ansatzes stellt hierbei die enorme Ineffizienz der homologen Rekombination dar (Hirata *et al.*, 2002), die ihrerseits wieder in einem sehr hohen initialen Analyse-Aufwand resultieren würde. Eine weitere Option hierfür bieten jedoch die so genannten Zinkfinger-Nukleasen (Qiao *et al.*, 2009), auf deren Funktion bereits eingegangen wurde (1.5). Mit ihrer Hilfe ist eine höchst effiziente gezielte Integration in eine definierte genomische Position durchführbar. Wie von Carroll (2008) in einem Übersichtsartikel zusammengefasst wurde, sind auf diesem Weg bislang verschiedene Genorte in unterschiedlichen Organismen und Zellen angesteuert worden. Publiziert wurde unter anderem das Targeting mittels Zinkfinger-Nukleasen für die therapeutische Anwendung für das Gen der Interleukin-2 Rezeptor gamma-Kette (IL-2R γ) in humanen Zellen (Lombardo *et al.*, 2007; Moehle *et al.*, 2007) und das Gen des humanen Chemokin-Rezeptors CCR5 in humanen T-Zellen (Perez *et al.*, 2008). Zinkfinger-Nukleasen für das

Targeting des *dhfr*-Gens des Hamsters konnten für CHO-Zellen gezeigt werden (Santiago *et al.*, 2008) und versprechen eine Anwendung für das metabolische Engineering von Kulturzellen. Eine Nutzung der Zinkfinger-Nukleasen zur Generierung von hochproduzierenden Zelllinien ist entsprechend denkbar, da mit diesem System das GOI gerichtet in eine herausragende Expressions-Lokation eingebracht werden kann. Bislang ist jedoch ein solcher Gen-Ort nicht bekannt, wobei fraglich ist, ob ein solcher Gen-Ort aufgrund der biologischen Komplexität überhaupt existiert bzw. zur Expression von Transgenen nutzbar gemacht werden kann.

3.3 Strategie zur Isolation eines RMCE-kompatiblen Produktionsklons

Wie in der Zielsetzung der Arbeit (2.1) beschrieben wurde, sollte im Rahmen dieses Promotionsprojektes ein Expressionssystem rekombinanter Antikörper in CHO-Zellen unter Verwendung des RMCE-Systems entwickelt werden. Es wurde mehrfach publiziert (Bode *et al.*, 2003b; Bode *et al.*, 2000b; Oumard *et al.*, 2006; Qiao *et al.*, 2009), dass die Expression ausgehend von einer einzelnen, S/MAR-flankierten und von multiplen Gen-Kopien vergleichbare Produktivitäten erreicht. Einzelne Integrate vermitteln jedoch höhere Produktivitäts-Stabilitäten. Die Gen-Kopienzahl hat weiterhin einen wichtigen Einfluss auf die Anwendbarkeit von RMCE, da für das Vorkommen von multiplen Gen-Kopien mehrere Konsequenzen möglich sind. „Head-to-tail“-Integrate sind in diesem Fall die günstigste Variante, da Exzisionen zwischen den identischen *FRT*-Erkennungsstellen auftreten können, die zu einer Reduktion der Kopienzahl führen. Andere, kompliziertere Anordnungen multipler Kopien können jedoch weitaus drastischere Folgen haben, wie beispielsweise unkontrollierte Deletionen, Inversionen oder Translokationen (Bode *et al.*, 2000b).

Dabei war das Ziel, eine RMCE-kompatible Basiszelllinie zu etablieren. Diese Zelllinie sollte von einer einzelnen genomischen Kopie ausgehen, die durch flankierende S/MARs gegen Positionseffekte abgeschirmt war. Bei der Durchführung der Versuche ergaben sich einige Erkenntnisse, die eine Optimierung der Selektionsstrategie erforderten. Die ursprünglich geplante Strategie sah vor, nach dem Elektroporations-Protokoll von Baer *et al.* (2000) zunächst stabile Transfektanten-Klone mit einer genomischen Kopie des Transgens zu generieren und zu isolieren. Aus ihnen sollten in einem nächsten Schritt die Hoch-Produzenten identifiziert und auf RMCE-Kompatibilität getestet werden. Dies wurde als nötig erachtet, da bekannt ist, dass nur ungefähr 30 % der Klone RMCE-kompatibel sind (Oumard *et al.*, 2006). Qiao *et al.* (2009) nutzten hierzu eine andere Strategie: sie verifizierten den

Kopienstatus erst nach Durchführung eines ersten RMCE. Dabei machte man sich zu Nutze, dass die im Falle der Transfektion häufig auftretenden „head-to-tail“-Integrate in ihrer Kopienzahl aktiv durch die Flp-Rekombinase exzidiert werden.

Im durchgeführten Projekt war es jedoch nicht möglich, reine Subklone mit Einzelkopien zu generieren (2.2.4), weshalb auch die Analyse der spezifischen Produktivität über das entwickelte Selektionsprotein (2.3.1) vor Durchführung des RMCE nicht aussagekräftig war und daher vernachlässigt wurde.

Die Strategie wurde dem entsprechend geändert und sah nun vor, zunächst ausschließlich antibiotisch auf stabile Produzenten zu selektionieren, was aufgrund der im Vektor vorhandenen Neomycin-Resistenz möglich war (2.3.1). Die Analyse der Anzahl der Transgen-Kopien stand dabei nicht mehr zentral im Vordergrund. Ein Anliegen war es jedoch trotzdem, Populationen zu generieren, die größtenteils aus Zellen bestanden, die mit möglichst wenigen Gen-Kopien eine gute Expression aufwiesen. Daher wurden die zur Elektroporation verwendeten DNA-Mengen und die Menge des Selektionsmittels G418 titriert. Die Kultur, bei der mit geringster transfizierter DNA-Menge und höchstem Selektionsdruck stabile Klone generiert werden konnten, wurde dann für die weiteren Experimente verwendet. Entsprechend der Transfektions-Strategie wurde davon ausgegangen, dass die daraus resultierenden Subklone wenige Kopien des GOI an transkriptionell aktiven Loci enthielten (2.3.4), um den hohen Selektionsdruck kompensieren zu können.

Der hauptsächliche Anspruch der Arbeit war es, einen RMCE-kompatiblen Klon mit einer möglichst hohen spezifischen Produktivität zu generieren. Bezüglich einer stringenten Selektion auf Integration in einen geeigneten Genort existieren verschiedene Möglichkeiten. Das „weakening“ (=Schwächung) stellt dabei eine häufig genutzte Option dar. Die Expression des Selektionsmarker-Gens erfolgt dabei in einer abgeschwächten Form. Dies wird über einen schwachen Promotor oder ein nicht optimales Start-Codon erreicht, was eine verringerte Frequenz zur Initiation der Translation vermittelt (van Blokland *et al.*, 2007). Eine andere Möglichkeit bietet die Abschwächung der Resistenz durch Punktmutationen im Resistenzgen (Chen *et al.*, 2004; Sautter und Enenkel, 2005). Die transfizierten Zellen müssen diese abgeschwächte Resistenz durch hohe Expressionsniveaus kompensieren. Die Konsequenz daraus ist, dass ein mit dem Resistenzgen co-transfiziertes GOI entsprechend gut exprimiert wird, und der Anteil hoch-produzierender Zellen ebenso steigt wie die spezifischen Produktivitäten (Sautter und Enenkel, 2005).

Des Weiteren existieren die bereits erwähnten Systeme zur metabolischen Selektion (GS, DHFR). Sie bieten zusätzlich zu ihrer selektiven Stringenz die Möglichkeit, die Enzym-Gene selbst, die umgebende DNA und damit auch das co-lokalisierte GOI zu amplifizieren. Dies wird über eine schrittweise Steigerung des entsprechenden Enzym-Inhibitors erreicht, was

eine Kompensation durch erhöhte Gen-Kopienzahl des Selektionsmarkers erfordert. Der Vorteil solcher metabolischen Selektionsansätze könnte in Hinblick auf die Generierung eines RMCE-kompatiblen Hochproduzenten darin liegen, dass aufgrund ihrer hohen Stringenz die Kultur schon vor dem Kassettenaustausch nur aus sehr guten Produzenten bestehen würde, und damit die Wahrscheinlichkeit für die Identifikation eines Hochproduzenten, der gleichzeitig auch RMCE-kompatibel ist, steigt.

Die Anwendbarkeit einer solchen stringenten antibiotischen Selektion zur Generierung von Hochproduzenten-Zelllinien wird allerdings kontrovers diskutiert. Es gibt einige Hinweise darauf, dass eine initiale Selektion zur Generierung von stabilen Zelllinien einen repressiven Effekt auf benachbarte Transgene ausübt, was in einem signifikanten Stabilitätsverlust der Gen-Expression resultiert (Kim und Lee, 2008; Pham *et al.*, 1996). Artelt *et al.* zeigten für das prokaryotische *neo*-Resistenzgen, welches hier zur Selektion Verwendung fand, eine „Silencing“-Wirkung (1991). Diese war unabhängig von Integrationsort, Orientierung und Transkriptionsstatus und trat sowohl in transienten als auch in stabilen Transfektanten auf. Es wurde publiziert, dass diese Selektions-bedingten Produktivitätsverluste durch Anwendung von Zellsortierungsmethoden zur Generierung stabiler hoch-produzierender Klone anstelle von antibiotischer Selektion verhindert werden können (Kaufman *et al.*, 2008).

3.3.1 Das Selektionsprotein als Imitation des Zielproteins

Vor Durchführung des RMCE sollten Klone mit hoher spezifischer Produktionsrate schnell und verlässlich identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Selektionskonstrukt (Abbildung 2-3) entwickelt, welches zur Identifikation von Zellen verwendet werden sollte, die die Kapazität besitzen, große Mengen rekombinanten Antikörpers in den Zellkulturüberstand sezernieren. Dies bedeutet nicht nur eine hohe Anforderung an die Expressions-Kapazität, sondern auch an die Sekretions-Kapazität der Zelle. Eine Korrelation zwischen der Menge des intrazellulären Produktes und der Produktionsrate ist in vielen Fällen gegeben. Bei der Sekretion des in der Zelle produzierten Proteins handelt es sich allerdings um einen limitierenden Schritt, weil die Proteine dabei im endoplasmatischen Retikulum ihre native Konformation erhalten, assembliert werden, und falsch gefaltete Proteine ausgelesen werden (Barnes und Dickson, 2006; Brezinsky *et al.*, 2003; Dinnis *et al.*, 2006). Die Menge des intrazellulären Produktes korreliert daher nicht zwangsläufig mit der sezernierten Menge des Proteins (Kim *et al.*, 1998b). Im Vergleich zu der von Qiao *et al.* angewandten Sortierung auf Klone mit hoher intrazellulärer Reportergen-Expression erschien es sinnvoller, eine Situation zu generieren, die die Proteinproduktion in Hinblick auf Expression und Sekretion

möglichst realistisch widerspiegelte. Dazu wurde das Selektionskonstrukt so geplant, dass es möglichst eine Imitation des Zielproteins, also eines Antikörpers, darstellte. Das dem Selektionsprotein ursprünglich zugrunde liegende Gen war eine murine schwere *IgG1*-Antikörperkette. Diese wurde so modifiziert, dass die variable Region durch das *egfp*-Gen ersetzt wurde (siehe Abbildung 2-3, 2.3.1 und Abbildung 3-1).



Abbildung 3-1: Anordnung der Komponenten des Selektions-Konstruktes in der MCS. MCS=Multiple Klonierungsstelle („Multiple Cloning Site“); *hcmv*=humaner Zytomegalievirus-Promotor („Human cytomegalovirus IE1 promoter“); *egfp*=„enhanced green fluorescent protein“; *mhc*=konstante Region der Maus-IgG1-Antikörperkette (in Anlehnung an Busch, 2005b).

Das Gen für das grünfluoreszierende Protein EGFP wurde in das Konstrukt integriert, um Produzenten auf intrazellulärer Ebene mittels Durchflusszytometrie identifizieren zu können (Gubin *et al.*, 1997; Mancina *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2000). Durch eine vorgeschaltete sekretorische Signalsequenz war es zusätzlich möglich, nach Sekretion den Immunglobulin-Teil des Fusionsproteins mit hoher Sensitivität mittels ELISA im Zellkulturüberstand nachzuweisen. Dies konnte zunächst in einem transienten Versuch (2.3.3) und im weiteren Verlauf für die stabilen Transfektanten mehrfach gezeigt werden.

Ein ähnliches System zur Analyse von Produzentenklonen wurde bereits von DeMaria *et al.* (2007) publiziert. Sie zeigten die Co-Expression des Oberflächenproteins CD20, welches normalerweise in CHO-Zellen nicht exprimiert wird, und des therapeutischen Zielproteins über eine IRES-Sequenz. Da diese beiden Proteine auf einer gemeinsamen mRNA basieren, gibt das Expressions-Niveau des Reporterproteins CD20 direkten Aufschluss über die relative Expression des Zielproteins und kann zur Identifikation von hoch-produzierenden Klonen verwendet werden. Auch die Verwendung eines Fusionsproteins bestehend aus dem amplifizierbaren Metallothionein-Gen und GFP konnte für eine Hochdurchsatz-Selektion rekombinanter CHO-Zellen auf klonaler Ebene gezeigt werden (Bailey *et al.*, 2002).

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Selektionsprotein griff damit den Ansatz auf, sich die korrespondierenden Expressionsniveaus der beiden Fusionspartner zu Nutze zu machen (Liu *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu den erwähnten Reportersystemen bot das EGFP-mHc jedoch den Vorteil einer Quantifizierung des Proteins im Zellkulturüberstand und damit die Möglichkeit, den limitierenden Schritt der Sekretion des synthetisierten Proteins damit kontrollieren zu können. Trotz dieser immensen Vorteile, die das Selektionsprotein gegenüber anderen publizierten Strategien bot, waren doch auch einige Nachteile zu beobachten. Da das EGFP-mHc sezerniert wurde, akkumulierte es nicht so in den Zellen, wie es für intrazelluläres EGFP beobachtet wird. Das bedeutet einerseits natürlich, dass es nicht zur Identifikation von falsch-positiven Hoch-Produzenten kommen konnte. Es war jedoch möglich, dass geeignete Produzenten, die eine sehr effiziente Sekretionsmaschinerie besaßen, das Fusionsprotein schneller sezernieren konnten als sie es nachproduzierten und daher in der Durchflusszytometrie schwach positiv für EGFP erschienen. Dies konnte auch eine Erklärung für die in den MACSQuant-Analysen von Produzentenklonen beobachteten wenig distinkten, diffusen EGFP-Populationen sein (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Limitierender Faktor: Gen-Kopienzahl oder RMCE-Kompatibilität?

Eine grundlegende Überlegung für die Strategie zur rekombinanten Zelllinien-Entwicklung ist die Frage nach der Anzahl der Transgene im Gen-Ort. Kann es überhaupt möglich sein, von einer einzelnen genomischen Kopie des GOI Produktivitäten zu erzielen, die von der zehn- bis hundertfachen Anzahl an Integraten erreicht werden können? Hierzu divergieren die Meinungen. Viele negative, meist epigenetische Effekte, sprechen gegen die Entwicklung von Produktionszelllinien, die auf multiplen Gen-Kopien basieren. Es ist bekannt, dass mehrere Kopien zu Rekombination, Chromosomenabberationen (Derouazi *et al.*, 2006) und „Repeat-induced silencing“ (Garrick *et al.*, 1998) führen. Häufig kommt es auch zu einem Verlust eines Teils der Gen-Kopien und damit zu einem Einbruch der spezifischen Produktivität (Kim und Lee, 2008). Eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der Gen-Kopien und der produzierten Antikörpermenge besteht ebenfalls nicht. Oftmals wurde für Gen-amplifizierte Klone nachgewiesen, dass die höhere Produktion vielmehr signifikant erhöhten mRNA-Mengen entsprach (Jiang und Sharfstein, 2008; Reisinger *et al.*, 2008), und es wurde beobachtet, dass die Expressionshöhe eher vom Integrationsort als von der Anzahl der Integrate abhängt (Wirth *et al.*, 1988). Da hohe Gen-Kopienzahlen hauptsächlich durch Gen-Amplifikation erreicht werden, gibt es auch zeitliche Einschränkungen. Da mehrere Amplifikations- und Analyse-Zyklen durchlaufen werden müssen, dauert es auf diesem Weg

bislang oft 9 bis 12 Monate, bevor die Zelllinie zur Produktion eingesetzt werden kann. Außerdem gilt es zu bedenken, dass der Prozess für jedes neue GOI komplett durchlaufen werden muss. Basierend auf Gen-Amplifikationsmechanismen wurden allerdings Produktivitäten im Bereich von 40 bis 80 pcd publiziert, die beweisen, dass der hohe Aufwand gerechtfertigt ist (Borth *et al.*, 2000; Fann *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2006; Lattenmayer *et al.*, 2007).

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit wurde, wie in 2.3.4 erläutert, die Strategie dahingehend umgestellt, dass von einer Beschränkung der Experimente auf Klone mit einer einzelnen Gen-Kopie Abstand genommen wurde. Die Transfektion wurde so durchgeführt, dass Klone mit geringen Kopienzahlen selektioniert werden sollten, was jedoch nicht verifiziert wurde (2.3.4).

Für die Wahrscheinlichkeit der Generierung von Einzelkopie-Klonen gibt es unterschiedliche Annahmen. Baer *et al.* zeigten (Baer *et al.*, 2000), dass Elektroporation unter bestimmten Bedingungen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit von 13 bis 37 % zu Einzelkopie-Integrationen führt. Im Falle multipler Integrationen kommt es mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu zwei (17 bis 42 %) oder mehr (29 bis 61 %) Integrationen, wobei hier der Großteil an mehreren Genorten integriert. Mit einer geringen Wahrscheinlichkeit kommt es bei Integration an einem Genort zu „tail-to-tail“-Integration, die „head-to-head“- oder die „head-to-tail“-Integration ist hierbei sehr unwahrscheinlich. Letztere tritt häufig bei Verwendung der Calcium-Phosphat-Transfektion auf (Bode *et al.*, 2003b), wobei die FLP-Rekombinase in diesem Fall die Gen-Kopienzahl aktiv reduzieren kann (Oumard *et al.*, 2006). Es gibt außerdem Untersuchungen, in denen mit einer Häufigkeit von 9 % Subklone mit einzelnen Transgen-Kopien etabliert wurden (Kim und Lee, 2008). Qiao *et al.* (2009) fanden, dass stabile Transfektionen mit anschließender Gen-Kopienzahl-Analyse zufällig ausgewählter Klone ergaben, dass 80 % der Subklone einzelne und zudem RMCE-kompatible Integrate besaßen.

3.3.2.1 Kombination der RMCE-Strategie mit Gen-Amplifikationsmechanismen

Die im Rahmen des Promotionsprojektes bis zu diesem Zeitpunkt erarbeitete Strategie zur Entwicklung einer Produktionszelllinie ist aus ökonomischer Sicht trotz der bereits beschriebenen immensen Vorteile des RMCE-Systems nicht interessant. Wie erläutert, bestand hier ein enormer Selektionsaufwand, der sich mit der Problematik der Generierung von Einzelkopie-Klonen begründen lässt. Die erreichten Produktivitäten von 0,5 bis 1,5 pcd lagen mit Faktor 15 bis 40 deutlich unter den für eine ökonomische Produktion benötigten Werten von mindestens 20 pcd (Wurm, 2004). Dennoch wird RMCE als äußerst viel

versprechend eingeschätzt und verspricht, durch Optimierungen in der Selektionsstrategie auch für industrielle Anforderungen und Fragestellungen interessant zu bleiben.

In dem Fall, dass die Integration von Einzelkopien an verschiedenen Gen-Lokationen erfolgt, sinkt die Wahrscheinlichkeit eines vollständigen Austauschs der Kopien jedoch drastisch (siehe 3.4). Dies wird durch die angewendete phänotypische Analyse zusätzlich erschwert, was das durchgeführte Projekt eindeutig bestätigt.

Auch in Hinblick auf die Höhe der erreichten spezifischen Produktivitäten ist die Anzahl der Gen-Kopien kritisch zu diskutieren. Multiple Transgene werden nicht proportional zur Kopienzahl exprimiert (Jiang *et al.*, 2006; Reisinger *et al.*, 2008). Therapeutische Antikörper werden jedoch trotzdem häufig unter Verwendung der Gen-Amplifikations-Systeme DHFR und GS produziert. Dabei können Produktivitäten von bis zu 80 pcd (Borth *et al.*, 2000; Fann *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2006; Lattenmayer *et al.*, 2007) mit Kopienzahlen von zehn (GS) bis zu mehreren hundert (DHFR) erreicht werden (Butler, 2005), was Werten von bis zu 3 pcd für RMCE-generierte Klone mit einzelnen Gen-Kopien gegenüber steht (Kim und Lee, 2008). Das erwähnte Risiko einer Instabilität der Gen-Expression nach Absetzen des Selektionsdruckes besteht dabei jedoch vor allem für Zelllinien mit hohen Transgen-Kopienzahlen (Fann *et al.*, 2000).

Eine interessante Anwendung für das RMCE-System stellt möglicherweise die Verknüpfung der ortsspezifischen Rekombination mit Gen-Amplifikations-Mechanismen dar. Es ist vorstellbar, eine Zelllinie mit guter Basis-Produktivität unter Verwendung eines Selektionskonstruktes zu etablieren, welches neben dem Selektionsgen und *FRT*-Erkennungsstellen zusätzlich einen amplifizierbaren Marker, wie beispielsweise das *gs*-Gen oder alternativ das *dhfr*-Gen, enthält (Abbildung 3-2). Durch einen RMCE kann dann das Selektionsgen wie gewohnt gegen das GOI getauscht werden. Nach Verifikation der spezifischen Integration des GOI im Gen-Ort könnte die Zelllinie dann den Amplifikations-Schritten unterworfen werden, die selbstverständlich erneut Produktivitätsanalysen erfordern. Kim *et al.* (2001) haben mit dieser Strategie unter Applikation von 0,32 μ M MTX die spezifische Produktivität eines Klons erfolgreich um Faktor 12,5 auf 8 pcd gesteigert. Es besteht demnach die Möglichkeit, eine Zelllinie zu identifizieren, bei der nicht nur ein guter Gen-Ort gezielt angesteuert werden kann, sondern von der auch bekannt ist, dass eine Amplifikation mit guten Resultaten im Anschluss an den Kassettenaustausch möglich ist.

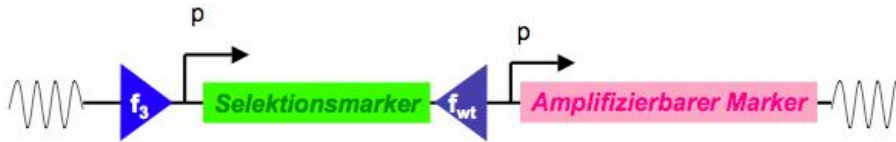


Abbildung 3-2: Selektionskonstrukt mit zur kombinierten Anwendung von ortsgerichteter Integration und Genamplifikation zur Generierung einer Produktionszelllinie. Das amplifizierbare Marker-Gen wird zur initialen Selektion und zur Gen-Amplifikation verwendet. f_3 , f_{wt} =FRT-Erkennungsstellen („flippase-recognition-target“) der Fip-Rekombinase; p=Promotor; Selektionsmarker=Gen für die Selektion auf Hochproduzenten-Zellen, beispielsweise *egfp-mhc*; Amplifizierbarer Marker=beispielsweise *gs*-Gen oder *dhfr*-Gen.

3.4 RMCE I: Selektionsprotein versus Antikörper

Unter Berücksichtigung aller Analyse-Schritte, die durchgeführt werden mussten, um im Verlauf des Projekts RMCE-positive Klone zu identifizieren, wurde deutlich, dass die Effizienz des RMCE mit der gewählten Selektionsstrategie äußerst gering war. Von den sechs in den RMCE eingebrachten stabilen Transfektantenkulturen zeigten nur vier die gewünschten Signale in der durchflusszytometrischen Analyse, dass sie zur weiteren Klärung auf klonaler Ebene per Endpunktverdünnung subkloniert wurden. Von 1920 ausgesäten Subklonen wurden 73 Klone im ELISA als hum.IgG1-positiv identifiziert. Nach weiterer Analyse wurde in dem Klon 29.2D12 ein Kandidat gefunden, der aufgrund seiner heterogenen EGFP-Expression (3,7 % EGFP-positive Zellen, siehe 2.5.2) erneut subkloniert werden musste. Für die daraus resultierenden 320 analysierten Subklone wurden in der phänotypischen Analyse im ELISA 16 % als mIgG1-positiv, 17 % als hum.IgG1-positiv und 2 % doppelt positive Klone nachgewiesen, die sowohl humane als auch murine Fc-Teile sezernierten (Abbildung 2-14 und 2.5.3). In der Verifikation des RMCE-Status für 24 der 52 hum.IgG1-positiven Klone per PCR wurde später bewiesen, dass letztlich 12 Klone eindeutig RMCE-positiv waren. 12 weitere Klone waren RMCE-negativ, wobei zwei dieser Klone positiv sowohl für das *egfp-mhc* als auch für die *hum.IgG1*-Gene waren und drei Klone als negativ für beide Gene bestimmt werden konnten (2.5.4).

Basierend auf den zur weiteren Charakterisierung durchgeführten Southern Blot Analysen wurde im Nachhinein festgestellt, dass die aus dem RMCE-Ansatz resultierenden RMCE-positiven Subklone 29.2D12-6H4 und 29.2D12-6G12 keine einzelnen, sondern multiple Gen-

Kopien besaßen. Wie in der Abbildung 2-16 deutlich wird, erzeugte die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *hcmv*-Sonde mehrere spezifische Signale.

Für die Klone 29.2D12-6H4 und 29.2D12-6G12 zeigte der Southern Blot interessanterweise ein identisches Bandenmuster, daher wurde in Abbildung 2-16 nur der Klon 6H4 dargestellt. Das Signal für das interne Fragment von 3 kb war deutlich stärker als die anderen Signale, was einer erhöhten Fragmentmenge durch eine dreifache Gen-Kopie entsprechen könnte. Aufgrund der drei Signale mit einer Größe > 4,5 kb wurde geschlossen, dass drei einzelne Gen-Kopien an verschiedenen Gen-Orten lokalisiert sein mussten. Die Signale bei drei unterschiedlichen Größen ergaben sich dabei durch die drei verschiedenen Randfragmente der unterschiedlichen Gen-Orte. Eine Co-Lokalisierung mehrerer Gen-Kopien an einem Gen-Ort konnte aufgrund des Bandenmusters ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass in dem uns vorliegenden Fall die Elektroporation der CHO-DG44-Zellen zu einer Etablierung von multiplen Kopien an verschiedenen Gen-Orten geführt hat, ist neben der in Baer *et al.* unter bestimmten Elektroporationsbedingungen erzielten Einzelkopie-Integration ein für diese Methode mit 29 bis 61 % signifikant auftretendes Ereignis (2000).

Das Auftreten der beiden Signale bei 2,7 und 4,0 kb ließ sich weder mit einem erfolgreichen, noch mit einem nicht erfolgreichen RMCE in einer oder mehreren Kopien erklären. Dies führte zu der Überlegung, dass die Signale auf einer zufälligen Integration des Austauschkonstruktes ins Genom basieren könnten. Dies wurde mittels PCR überprüft. Mit spezifischen Oligonukleotiden, die im Vektor-Rückgrat des Austausch-Konstruktes binden, konnte für die erfolgreich RMCE-generierten hum.IgG1-Produzenten eine Sequenz entsprechender Größe amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher vermutet, dass die zusätzlichen Banden durch zufällig integriertes Austauschkonstrukt pExAk begründet waren, was laut Capecchi für permanente Zelllinien durch deren hohe Tendenz zur illegitimen Rekombination wahrscheinlich ist (Capecchi, 1990). Die Detektion dieser Vektorfragmente im Southern Blot war möglich, da die Antikörperketten innerhalb der Austausch-kassette den *hcmv*-Promotor trugen und somit über die gewählte *hcmv*-Sonde detektiert werden konnten.

Eine eindeutige Klärung der Aussage des Southern Blot konnte im Rahmen des Promotionsprojektes nicht mehr erarbeitet werden. Tatsache ist jedoch, dass die Daten in Kombination mit den PCR-Ergebnissen (2.5.4) eindeutig belegen, dass diese Klone in einem erfolgreichen RMCE-Experiment generiert wurden. Diese Feststellung konnte getroffen werden, da die Klone 29.2D12-6H4 und 29.2D12-6G12 laut PCR für das *egfp-mhc*-Fusionsgen defizient waren, das co-lokalisierte *neo^R*-Gen jedoch noch durch PCR nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich exprimierten sie den hum.IgG1-Antikörper, dessen Gene ebenfalls in der PCR nachgewiesen werden konnten.

Eine weitere, detaillierte Untersuchung des Vorkommens des Austauschkonstruktes außerhalb der Selektionskassette auf genomischer Ebene mittels Southern Blot war im Rahmen der Arbeit nicht mehr möglich. Die Vermutung, dass die mehrfachen spezifischen Signale nach Hybridisierung mit der *hcmv*-Sonde im Southern Blot nicht durch multiple Gen-Kopien an verschiedenen Lokationen in einem Klon sondern durch ein Klongemisch mit einzelnen Integraten erzeugt worden waren, bestand. Sie ließ sich jedoch durch das zufällige Auftreten unabhängig von einander identifizierter, analysierter und kultivierter Subklone (6H4 und 6G12) widerlegen. Die Vermutung, dass diese aus einem gemeinsamen Vorgänger entstanden und zufällig beide isoliert worden waren, war hier als sehr wahrscheinlich anzunehmen.

3.4.1 Auswahl RMCE-kompatibler Klone nach phänotypischen Analysekriterien

Es ist wichtig, bei der Bewertung der Effizienz des RMCE zu berücksichtigen, dass der primären Identifikation RMCE-positiver Klone ausschließlich phänotypische Kriterien zu Grunde gelegt worden waren (siehe 2.5.2 und 2.5.3). Dies hat sich auch in den von Qiao *et al.* (2009) durchgeführten Experimenten als erfolgreich erwiesen, wobei in diesen Versuchen eine andere Selektions- und „Promotor-Outside“-Strategie verwendet worden war.

War wie im hier vorliegenden Fall für die Ausgangskulturen, wie im Nachhinein bestätigt, ein Mehrkopienstatus anzunehmen, konnte man vermuten, dass eine große Anzahl von analysierten Klonen RMCE zwar erfolgreich durchlaufen hatte, jedoch nicht mit allen Gen-Kopien, also nur partiell. Wie in Tabelle 1-1 dargestellt, waren partiell erfolgreiche RMCE-Ereignisse aufgrund ihres RMCE-negativen Phänotyps nicht zu identifizieren. Sie wurden also von vornherein für weitere Untersuchungen ausgeschlossen und in der Statistik nicht erfasst. Klone, die nach dem Experiment neben hum.IgG1 keine messbaren Mengen an mIgG1 in den Zellkulturüberstand sezernierten, aufgrund eines partiellen Austauschs jedoch noch im Genom verbliebene Kopien des *egfp-mhc* trugen, wurden durch den Nachweis des Fusionsgens für nachfolgende Analysen eliminiert (2.5.4).

Diese Überlegung liefert eine Erklärung für die vielen phänotypisch und genotypisch doppelt-positiven Klone und deutet andererseits darauf hin, dass die Effizienz des durchgeführten RMCE sehr viel höher war, als nachgewiesen werden konnte. Qiao *et al.* (2009) konnten in ihren Experimenten zeigen, dass im Falle der Anwendung eines stringenten Selektions-Verfahrens ohne Verwendung einer antibiotischen Selektion eine RMCE-Effizienz von ungefähr 10 % auf klonaler Ebene erzielt werden konnte. Die tatsächliche Effizienz der

Rekombinase-vermittelten Austauschreaktion für die im Rahmen der Arbeit generierten Konstrukte bei Anwendung in CHO-DG44-Klonen konnten wie erläutert in diesem phänotypischen Auswahlverfahren nicht festgestellt werden. Es muss aber davon ausgegangen werden, dass RMCE mit reinen Einzelkopie-Klonen zu deutlich höheren Ausbeuten an sowohl phänotypisch als auch genotypisch RMCE-positiven Klonen geführt hätte. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kassettenaustausch in allen multiplen Gen-Kopien in einem Genom funktioniert und dieser Klon auch identifiziert wird, ist als sehr gering einzustufen. Hieraus wird deutlich, dass ein Ansatz mit Zellen mit multiplen Gen-Kopien bei einer phänotypischen Selektionsstrategie den Analyse-Aufwand zur RMCE-Identifikation enorm erhöhen kann.

3.5 RMCE II: Antikörper versus Selektionsmarker

Aufgrund der aus dem Southern Blot gewonnenen Erkenntnisse war nun der Mehrkopienstatus des Klon 29.2D12-6H4 nach dem RMCE von *egfp-mhc* gegen *hum.IgG1* bekannt. Wurde dieser Klon als Parentalklon für weitere RMCE-Experimente eingesetzt, musste erwartet werden, dass hier ebenfalls nur eine sehr geringe phänotypisch nachweisbare RMCE-Effizienz auftreten würde, die möglicherweise noch geringer war, als die des RMCE I. Dies lag einerseits am bereits beschriebenen Problem der hauptsächlich partiellen RMCE-Ereignisse und der damit verbundenen Unzulänglichkeit des phänotypischen Nachweises. Vermutlich kam es auch dazu, dass partiell ausgetauschte Klone im phänotypischen Selektionsprozess dadurch von vornherein von den weiteren Analysen ausgeschlossen worden waren und daher nie identifiziert wurden, weil die Subklone weiterhin detektierbar *hum.IgG1* sezernierten. Ein zusätzlich sehr kritischer Punkt in Hinblick auf eine Identifikation von vollständig RMCE-positiven Klonen mit entsprechendem Phänotyp ergab sich dadurch, dass durch die zufällige Integration des pEx im RMCE I möglicherweise weitere FRT-flankierte Kassetten vorlagen, die die Zahl der auszutauschenden Kopien zusätzlich erhöhten und damit die Wahrscheinlichkeit eines vollständigen Austauschs weiter verringerten.

Im vorliegenden RMCE-Experiment ergab sich noch eine zusätzliche Schwierigkeit: im Falle eines erfolgreichen Kassettenaustausches wurde eine Hygromycin B-Resistenz vermittelt. Nach Co-Transfektion der RMCE-Komponenten hatte ein Großteil der Klone scheinbar wie erwartet eine Hygromycin B-Resistenz entwickelt. Zusätzlich sezernierten diese Klone jedoch weiterhin *hum.IgG1* in den Zellkulturüberstand, obwohl die *hum.IgG1*-Kassette im

Falle eines vollständigen RMCE nicht mehr genomisch vorliegen durfte. Es war nun aufgrund der Erfahrungen im ersten RMCE zu erwarten, dass die Resistenz bei nicht erfolgreichem RMCE ebenfalls auf einer zufälligen Integration des Austauschkonstruktes in das zelluläre Genom basierte, oder durch einen partiellen Austausch zu begründen war. In beiden Fällen würden sowohl *hum.IgG1* als auch *hyg^rk* genomisch vorliegen. In den PCR-Analysen zur Überprüfung des RMCE-Erfolges zeigte sich jedoch, dass keiner der analysierten Klone das *hyg^rk*-Gen trug. Die Klone überlebten das applizierte Antibiotikum trotz einer für die Kontrollkulturen letalen Konzentration, ohne das entsprechende Selektionsmarker-gen genomisch etabliert zu haben. Dies ist nur damit zu erklären, dass die Zellen eine spontane Resistenz aufgebaut haben.

Wie sich in diesem Projekt deutlich zeigte, bestand das generelle Problem der Identifikation falsch-positiver RMCE-Klone, wie es von Qiao *et al.* beobachtet wurde (2009). Auch hier resultierte die Auswahl dieser Klone unter anderem aus der Integration des Austauschkonstruktes ins Genom. Einen Lösungsansatz dazu stellt die Anwendung eines so genannten „Promotor-Trap“ dar (Di Domenico *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2009). Dabei zeigen beispielsweise durch Voranstellen des Promotors oder des Startcodons vor die 5'-flankierende FRT-Erkennungsstelle nur solche Klone den RMCE-Phänotyp, die aus einer erfolgreichen Austauschreaktion resultieren, da eine ungerichtete Integration des Promotor- oder Startcodon-freien Austausch-Konstruktes nur dann phänotypisch sichtbar wird, wenn sie an der spezifischen Position in einem Gen-Ort geschieht, die eine Expression ermöglicht. Bei einer gezielten Integration in den gewünschten Gen-Ort wird die Expression durch die außerhalb der Austausch-kassette integrierten Elemente möglich.

3.6 Steigerung der Effizienz von RMCE

3.6.1 Erhöhung der Flp-Rekombinase-Aktivität

Um eine hohe RMCE-Effizienz zu erzielen, muss eine sehr ausgefeilte Strategie angewendet werden. Eine Möglichkeit, RMCE-Effizienzen zu steigern, besteht darin, eine in Hinblick auf Expressionshöhe und Funktionalität optimierte Flp-Rekombinase zu verabreichen. Solche Expressions- und Effizienz-steigernden Optimierungen der Flp-Rekombinase sind in der Geschichte des Flp/FRT-Systems bereits mehrfach vorgenommen worden. Eine thermo-stabile Form der ursprünglich ineffizienten, thermolabilen Flp-Rekombinase wurde durch eine stringente Selektion in *Escherichia coli* identifiziert (Buchholz *et al.*, 1996). Sie kann mit

einer vierfach gesteigerten Rekombinationseffizienz für mammalische Zellen verwendet werden (Buchholz *et al.*, 1998). Mit der *de-novo*-Synthese einer Codon-optimierten Flp-Variante (FlpO) konnte eine Rekombinationseffizienz erreicht werden, die der der Cre-Rekombinase entspricht. Basierend darauf wurde in Anlehnung an *flpe*-IRES-*pac* die *flpo*-IRES-*pac* Vektorvariante (pFlpO-puro) entwickelt (Raymond und Soriano, 2007). Es ist bekannt, dass Puromycin Zellen schon innerhalb 24 bis 48 Std. tötet, wenn diese das Puromycin N-acetyltransferase (*pac*)-Gen nicht transient exprimieren (Taniguchi *et al.*, 1998). Das Konstrukt ermöglichte also eine Verwendung zur kurzfristigen Selektion auf den transienten Status des Vektors.

Da die Rekombinase den Zellen als Vektor in einer Co-Transfektion zugeführt wird, besteht neben der Optimierung der Enzymeffizienz auch die Möglichkeit einer Effizienzsteigerung durch eine Erhöhung der intrazellulären Flp-Rekombinase-Menge. Dies kann auf der einen Seite durch eine effektive Expression der Flp-Rekombinase unter einem starken Promotor wie in pFlpE-CAGGS geschehen (Schaft *et al.*, 2001). Zu einer effektiveren Steigerung der Kassettenaustausch-Effizienz würde vermutlich aber auch eine gesteigerte Transfektionseffizienz führen. Es ist während der Durchführung des Experiments nicht bekannt oder sichergestellt, wie groß der Anteil der erfolgreich Rekombinase-transfizierten Zellen tatsächlich ist. Dank der Entwicklung des pFlpO-puro-Konstruktes ist zwar die Möglichkeit zur Selektion vorhanden, die jedoch, wie erwähnt, nur kurzfristig zur transienten Selektion genutzt wird.

Um hier zu weiteren Optimierungen anzusetzen, ist beispielsweise eine Kombination der Expression von Flp-Rekombinase mit einem Oberflächenmarker denkbar. So könnte eine Positiv-Anreicherung transient Rekombinase-positiver Zellen über MACS[®] durchgeführt werden. Da die Flp-vermittelte Rekombination innerhalb von Stunden nach der Transfektion abläuft (Peitz *et al.*, 2002), wäre die Anreicherung schon kurz nachher möglich. Sie würde dazu führen, dass nur Zellen analysiert werden müssten, die FlpO-puro aufgenommen haben und exprimieren, und so überhaupt die für RMCE benötigten Grundvoraussetzungen erfüllen. Der enorme Analyse-Aufwand könnte so schon frühzeitig reduziert werden. Eine weitere Alternative kann hier die von Bode *et al.* (2003b; 2000b) und Oumard *et al.* (2006) vorgeschlagene Kombination der Rekombinase mit einem fluoreszenten Reporterprotein darstellen, wodurch eine FACS-Sortierbarkeit auf transient Flp-Rekombinase exprimierende Zellen gegeben ist. Ebenfalls von Interesse wäre ein Vergleich der Maus-Codon-optimierten FlpO mit einer CHO-Codon-optimierten Rekombinase. Möglicherweise wäre hierdurch ebenfalls noch eine Effizienzsteigerung zu erreichen, wobei die Codon-Verwendung in Maus und CHO allerdings kaum Unterschiede aufweist (persönliche Kommunikation mit Arndt Dankesreiter, Geneart AG, Regensburg). Ebenfalls zu prüfen wäre der Erfolg eines Ansatzes, bei dem die RMCE-Co-Transfektion nicht nur einmalig durchgeführt und

anschließend auf RMCE-positive Klone selektioniert würde, sondern bei der mehrfach hintereinander alle RMCE-Komponenten co-transfiziert würden. Besonders im Falle multipler Transgen-Integrate sollte dies die Wahrscheinlichkeit eines vollständigen Austauschs drastisch erhöhen.

3.6.2 Positionseffekte und ihre Auswirkung auf RMCE-Effizienz

Das Ausmaß des Einflusses struktureller Eigenschaften des umgebenden Chromatins auf die Transgen-Expression ist ebenso unklar, wie der Einfluss dieser so genannten Positionseffekte auf RMCE-Kompatibilität und –Effizienz. Die Rekombination identischer *FRT*-Erkennungsstellen kann durch Chromatinstrukturen negativ beeinflusst werden (Vooijs *et al.*, 2001). Seibler *et al.* haben eine „tag and exchange“ Strategie vorgeschlagen (1998), die es ermöglicht, Klone unter Verwendung einer Positiv-Negativ-Selektion auf RMCE-Kompatibilität zu testen. Diese Strategie sieht die Integration einer *FRT*-flankierten *hyg^{tk}*-Kassette mit einer antibiotischen Selektion über Hygromycin B vor. Im Anschluss daran wird ein erster RMCE durchgeführt und auf Ganciclovir-Resistenz selektioniert, da die Zellen, die das *hyg^{tk}*-Fusionsgen nicht ausgetauscht haben und daher das Thymidin-Kinase-Gen noch tragen, Ganciclovir-sensitiv sind. Resultierende Klone sind RMCE-kompatibel und tragen nach dem Austausch keine Selektionsmarker-Gene mehr.

Es gibt Untersuchungen, die bestätigen, dass die RMCE-Kompetenz unter gleichen Bedingungen Gen-Ort-abhängig ist (Qiao, 2005). Da die Struktur des umgebenden Chromatins die RMCE-Kompatibilität und –Effizienz beeinflusst, liegt auch die Vermutung nahe, dass eingebrachte S/MAR-Sequenzen die Wahrscheinlichkeit von Kassettenaustausch-Ereignissen begünstigen. Klehr *et al.* zeigten (1992), dass S/MARs durch ihre hyperacetylierende Wirkung eine Entpackung des Chromatins vermitteln, was der Rekombinase und dem Austauschkonstrukt den Zugriff auf die Zielsequenz erleichtert. Das Strangtrennungspotential von S/MARs begünstigt zudem die Rekombination an *FRT*-Sequenzen.

Aus diesem Grund wurde entschieden, das Selektionskonstrukt mit den in vielen vorangegangenen Studien getesteten Sequenzen S/MAR-E und S/MAR-W zu versehen (siehe 1.3, Bode und Maass, 1988; Mielke *et al.*, 1990). Diese flankieren die gesamte Austausch-kassette um so ihre Effekte zur Optimierung des gesamten Konstruktes in Hinblick auf Expressionshöhe und –stabilität ebenso wie auf die Zugänglichkeit der *FRT*-Erkennungsstellen für die RMCE-Komponenten zu vermitteln (Bode *et al.*, 2003b). Wenn davon ausgegangen wird, dass die S/MAR-Sequenzen einen positiven Einfluss auf die

RMCE-Kompatibilität des Integrationsortes besitzen, muss auch vermutet werden, dass Natrium-Butyrat als Histon-Deacetylase-Inhibitor einen ähnlichen Effekt vermittelt. Es könnte analog zu den S/MARs die Zugänglichkeit der DNA und damit ihre Rekombinationsfähigkeit erhöhen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei *FRT*-Erkennungsstellen miteinander rekombinieren, nimmt mit ihrem Abstand zueinander ab. Ein Mindestabstand muss jedoch ebenfalls eingehalten werden. Da bei der RMCE-Reaktion Intermediate auftreten, bei denen sowohl das Selektions-Konstrukt als auch das Austausch-Konstrukt genomisch co-lokalisiert vorliegen, resultiert in diesem konkreten Fall aufgrund der Größe der einzubringenden Antikörpergene eine sehr große Distanz zwischen den identischen *FRT*-Erkennungsstellen (siehe Abbildung 3-3). Es ist aber publiziert, dass Konstrukte der vorliegenden Größenordnung und weit darüber hinaus erfolgreich Rekombinationsreaktionen durchlaufen können (Wallace *et al.*, 2007).

Allgemein ist jedoch zu bedenken, dass auch mit optimierten Reaktionsbedingungen für RMCE (sichergestellte Flp-Expression, optimale Verhältnisse der Komponenten und guter Gen-Ort) zu erwarten ist, dass nur ein geringer Teil der Zellen die doppelt-reziproke bi-molekulare RMCE-Reaktion nach dem Experiment wirklich durchlaufen haben wird (siehe Abbildung 3-3). Dies liegt daran, dass die Integration im Gegensatz zur Exzision thermodynamisch und kinetisch benachteiligt ist und daher äußerst ineffizient abläuft (Baer und Bode, 2001; Oumard *et al.*, 2006). Der wichtigste Schritt in einem nächsten Ansatz sollte daher sein, mit maximaler Effizienz auf erfolgreiche RMCE-Ereignisse zu selektionieren.

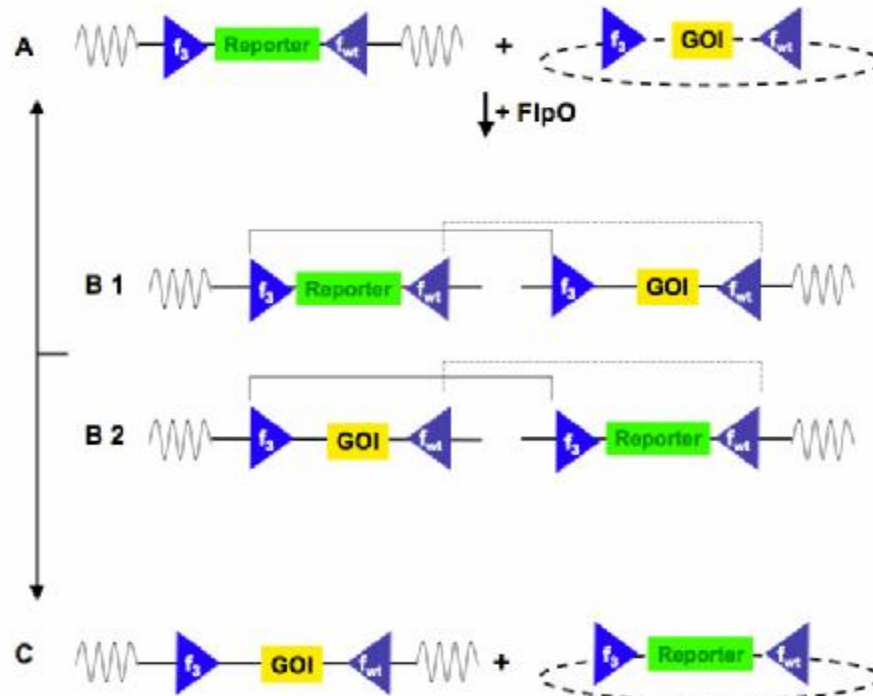


Abbildung 3-3: Intermediate der RMCE-Reaktion. Auf molekularer Ebene ergeben sich während eines Rekombinase-vermittelten Kassettenaustauschs (RMCE) zwei mögliche Intermediate (B1, B2) aus der initialen Integrationsreaktion des Austauschkonstruktes über f_{wt} bzw. f_3 . Die darauf folgende Rekombinase-vermittelte Exzisionsreaktion über die homospezifischen FRT-Erkennungsstellen resultiert entweder in einer wiederhergestellten Ausgangssituation (A) oder dem erwünschten Kassettenaustausch (C), bei dem das Reportergen gegen das GOI ausgetauscht wurde. GOI=Gen von Interesse („gene of interest“); FlpO=Codon-optimierte Flp-Rekombinase; f_{wt} und f_3 =heterospezifische FRT-Erkennungsstellen.

3.7 Ist RMCE für die industrielle Produktion geeignet?

Wie in 2.6.1 dargestellt, wurden die spezifischen Produktivitäten für die RMCE-positiven Subklone bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass die spezifischen Produktionsraten der generierten Klone mit 0,5 bis 1,5 pcd im Rahmen der bekannten Daten für RMCE-generierte Klone liegen. So wurde beispielsweise von Kim und Lee (2008) publiziert, dass die Anwendung von RMCE zur Generierung von stabilen Zelllinien zur Expression von Erythropoietin (EPO) erfolgreich war. Die Effizienz des RMCE lag dabei jedoch im besten Fall bei 3 %. Der best-produzierende resultierende Klon besaß eine spezifische Produktionsrate von ungefähr 2 pcd. Dabei ist zu beachten, dass EPO mit einer ungefähren

Größe von 35 kDa um Faktor 4 kleiner ist, als Antikörper-Moleküle. Eine weitere Studie belegte die erfolgreiche Generierung von Expressions-Klonen per RMCE mit einer erreichten spezifischen Antikörper-Produktivität von unter 1 pcd in CHO- und 1,5 bis 2 pcd in HEK-Zellen (Wirth *et al.*, 2009).

Bei einem Vergleich dieser Ergebnisse mit den hier gewonnenen Daten muss jedoch bedacht werden, dass aus den bereits mehrfach diskutierten Gründen keinerlei Selektion auf die Produktivität der Kulturen vor RMCE durchgeführt worden war. Dies unterscheidet die experimentelle Durchführung von der der publizierten Daten. Wären Klone in die RMCE-Experimente eingeflossen, die bereits im Vorfeld auf hohe spezifische Produktionsraten selektioniert worden wären, ist zu vermuten, dass die Etablierung von Klonen mit höherer spezifischer Produktivität nach RMCE effektiver gewesen wäre. Für den Fall, dass diese Produktivitäten auf mehreren co-lokalisierten Kopien basieren würden, könnte eine Reduktion der Produktionsrate resultieren, falls die Rekombinase im Falle von „head-to-tail“-Integraten die Kopienzahl aktiv reduzieren würde.

Eine mögliche Ursache für die niedrige und instabile Produktivität der generierten Klone ist das Vorliegen von S/MAR-Sequenzen in multiplen Gen-Kopien. Bode *et al.* publizierten (2003b), dass die S/MAR-Sequenzen in diesem Fall um die Assoziation mit der Kernmatrix konkurrieren, was in einer verringerten und instabilen Expression resultieren kann. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass die spezifische Produktivität der analysierten Klone durch die Zugabe von Natrium-Butyrat zum Zellkulturmedium nicht gesteigert werden konnte (2.6.1). Natrium-Butyrat gehört zu den Histon-Deacetylase-Inhibitoren, verhindert also Gen-Silencing durch die Blockade der Deacetylierung von Histonen. Es konnte bereits mehrfach erfolgreich zur Steigerung der spezifischen Produktivität in CHO-Zellen angewendet werden, wobei Erhöhungen um Faktor 2 bis 30 publiziert wurden (Jiang und Sharfstein, 2008; Qiao *et al.*, 2009; Schlake *et al.*, 1994). Um die RMCE-Strategie für die Großproduktion der pharmazeutischen Industrie nutzen zu können, müssen sicherlich Optimierungen in der Selektionsstrategie vorgenommen werden. Ein Vorschlag hierzu findet sich im Ausblick dieser Arbeit (3.9). Für die Produktion von Testmaterial für prä-klinische Analysen und Studien bieten RMCE-Strategien bereits jetzt ein hohes Potential, besonders in Verbindung mit einer effizienten Selektion auf hochproduzierende Zellen mit hoher sekretorischer Kapazität. Laut persönlicher Kommunikation mit Prof. Jürgen Bode sind mit optimierten Strategien bereits spezifische Produktivitäten von 40 bis 50 pcd möglich.

3.7.1 Relevanz des RMCE für die Forschung

Eine besonders hohe Relevanz kann dem RMCE-System hingegen für die Verwendung zu Forschungszwecken zugesprochen werden. Sehr interessant sind Ansätze, in denen der Einfluss einzelner Elemente auf die Gen-Expression getestet werden sollen. Ausgehend von einem RMCE-kompatiblen Transfektanten-Klon ist es unter Anderem denkbar, verschiedene S/MAR-Elemente und andere Chromatin-Elemente, sowie Promotoren und andere Expressions-relevante und -steigernde Sequenzen in Hinblick auf ihre Effekte zu untersuchen. Auch denkbar ist die Anwendung des RMCE-Systems in Bezug auf den direkten Vergleich der Auswirkung von Genen, die zum Zwecke des metabolischen „Engineerings“ in den Gen-Ort eingebracht werden können. Die Daten, die hieraus gewonnen würden, könnten unmittelbar miteinander verglichen werden, da die beobachteten Expressionseigenschaften auf Kulturen basieren, die sich nur im analysierten GOI unterscheiden. Optimalerweise kann im Falle der ortsspezifischen Rekombination der Effekt der genomischen Position der verglichenen Elemente vernachlässigt werden. Dies ist in Systemen, die auf dem konventionellen Weg mittels zufälliger genomischer Integration (siehe 1.2) generiert wurden, um den Einfluss von Genen und Strukturen auf die Expression zu untersuchen, nicht der Fall.

Ebenfalls von hoher Relevanz ist die Anwendung der von Cobellis *et al.* (2005) publizierten RMCE-Strategie für die Generierung transgener Mäuse. Durch Markierung von Gen-Orten mit *FRT*-Erkennungsstellen ist es möglich, Bibliotheken von ES-Zell-Klonen aufzubauen, auf deren Grundlage *in vivo*-Studien zur Erforschung humaner Erkrankungen möglich werden. Die Regulation der Genexpression im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz wird dabei durch RMCE nicht verändert.

3.7.1.1 Multiplex-RMCE

Eine sehr reizvolle Option zur Testung verschiedener genetischer Elemente und ihrer Einflüsse auf die Zelle bietet der Multiplex-RMCE. Analog zu einer publizierten Variante für das Cre/*loxP*-System (Sauer, 1996) ist dies auch unter Verwendung des Flp/*FRT*-Systems möglich (Bode *et al.*, 2000b; Oumard *et al.*, 2006). Hierfür werden mehrere heterospezifische *FRT*-Erkennungsstellen benötigt, mit deren Hilfe dann der spezifische Austausch von GOIs mehrerer integrierter Expressionskassetten auf genomischer Ebene möglich ist. Bislang ist nur die Anwendung der Kombinationen f_{wt}/f_3 (Cesari *et al.*, 2004; Kim und Lee, 2008; Qiao *et al.*, 2009; Seibler und Bode, 1997; Seibler *et al.*, 1998; Weidenfeld *et al.*, 2009) bzw. f_{wt}/f_5 (Cobellis *et al.*, 2005; Coroadinha *et al.*, 2006; Seibler und Bode, 1997) in singulären

Kassetten gängig. Das Multiplex-System befindet sich jedoch in der Entwicklung (persönliche Kommunikation mit Sören Turan, AG Prof. Jürgen Bode) und verspricht nach Fertigstellung neuer heterospezifischer *FRT*-Sequenzen die Nutzbarkeit zur Beantwortung komplexer Fragestellungen.

Als konkrete Anwendung wäre beispielsweise denkbar, ein Konstrukt zu generieren, welches den gezielten Austausch der Promotorsequenz unabhängig vom GOI ermöglicht, was damit die Testung der Effizienzen verschiedener Promotoren unter identischen Bedingungen zuließe.



Abbildung 3-4: Beispiel für eine mögliche Applikation von Multiplex-RMCE. S/MAR-E und S/MAR-W=Scaffold/Matrix-Attachment-Regions; f_x, f_{x+1}, f_{x+2} =neue mutante, heterospezifische *FRT*-Erkennungsstellen („flippase-recognition-target“) der Flp-Rekombinase; p=Promotor; Amplifizierbarer Marker=beispielsweise *gs*-Gen oder *dhfr*-Gen.

Eine weitere Alternative wäre ein Konstrukt zur Testung der Einflüsse verschiedener Chromatin-Elemente. Hierzu wären flexible Kassetten flankierend von einer ebenfalls austauschbaren GOI-Kassette sinnvoll.

Von besonderem Interesse im Rahmen der in dieser Arbeit behandelten Fragestellung wäre beispielsweise der Ansatz, der die genomische Integration zweier unabhängig voneinander austauschbarer Gen-Kassetten erlaubt. Damit wird eine duale Selektion auf die Expression beider Kassetten möglich. In diese könnten dann die schwere und leichte Antikörperkassette eingesetzt werden, was die Möglichkeit eröffnen würde, verschiedene Kombinationen von Expressionskonstrukten einzubringen. Die Verwendung unterschiedlicher Promotoren und deren Auswirkung auf die molaren Verhältnisse von schwerer zu leichter Antikörperkette könnten dabei von Nutzen sein. Es ist publiziert, dass in Hinblick auf die Produktivität ein Überschuss an leichten Antikörperketten vorteilhaft ist, was jedoch für jeden Antikörper und jeden Gen-Ort empirisch getestet werden muss (Borth *et al.*, 1999; Strutzenberger *et al.*, 1999). Li *et al.* zeigten (2007), dass ein optimales Verhältnis der Antikörperketten für eine maximale Sekretion sowohl vom gewählten Expressionssystem (mono- oder bicistronisch) als auch von der Wirtszelle abhängt.

3.8 Anwendung des “Antibody CHO Capture Systems” zur Positiv-Selektion von hum.IgG1-Produzenten nach RMCE

Die RMCE-kompatible Basiszelllinie, die im Rahmen der Experimente generiert werden sollte, war hauptsächlich als flexibles Expressionssystem für rekombinante humanisierte Antikörper geplant. Der nötige enorme Selektionsaufwand zur Identifikation RMCE-kompatibler Klone wurde hier ebenso wie diverse Ansätze zur Optimierung bereits mehrfach beschrieben.

Einen sicherlich äußerst attraktiven Lösungsansatz stellt die gezielte Anreicherung von RMCE-generierten hlgG-Produzenten dar. Dazu sind bereits mehrere Methoden publiziert worden, die auf der Immobilisierung des sezernierten Produktes in unmittelbarer Nähe der Produzentenzelle basieren. Ein Beispiel dafür stellt die „Gel Microdrop Technologie“ dar (Akseband *et al.*, 2003), für die Zell-Emulsionen aus Zellen in Tröpfchen geschmolzener, biotinylierter Agarose hergestellt werden, auf denen durch Avidin ein spezifischer „Fangantikörper“ fixiert wird. Dieser bindet das sezernierte Protein, welches über einen Fluoreszenz-markierten Detektions-Antikörper nachgewiesen werden kann. Des Weiteren existieren Matrix-basierte Sekretions-Assays, für die die Zelloberfläche mit einer künstlichen Matrix versehen wird, über die die Immobilisierung der Proteine erfolgt. Einige Methoden arbeiten zusätzlich über eine Kultivierung der Zellen in einem semi-soliden Medium, in dem die Diffusion des Produktes im Medium verlangsamt stattfindet. Die Zellen werden biotinyliert, mit einem Antikörper-Avidin-Konjugat oder einer Avidin-Brücke und einem biotinylierten Antikörper versehen, der das darzustellende Protein bindet, welches dann mittels eines Fluoreszenzantikörpers detektiert und sortiert werden kann (Hanania *et al.*, 2005; Holmes und Al-Rubeai, 1999; Manz *et al.*, 1995). Weiterhin existiert der Ansatz, die zu analysierende Kultur in einem semi-soliden Kulturmedium zu vereinzeln und bis zur Koloniebildung zu kultivieren. Das sezernierte Produkt wird wiederum in unmittelbarer Nähe der Zell-Kolonie immobilisiert und kann durch fluoreszente Antikörper detektiert werden (Lee *et al.*, 2006). Die Identifikation und Isolation der Hoch-Produzenten erfolgt dann manuell oder automatisiert mit Hilfe eines Mikroskops (Caron *et al.*, 2009), wobei beispielsweise der ClonePix von Genetix ein automatisiertes System darstellt (<http://www.genetix.com>).

Brezinsky *et al.* (2003) machten sich ein anderes und weitaus einfacheres Protokoll zur Produzentenanreicherung zu Nutze, indem sie stabile rekombinante CHO-Zellen bei niedrigen Inkubationstemperaturen mit einem für das sezernierte Zielprotein spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörper färbten. Klone mit besonders hohen Mengen an

detektierbarem Zielprotein wurden einzig basierend auf der Intensität des Fluoreszenz-Signals durch FACS-Sortierung isoliert und analysiert. Dabei wurde eine Steigerung der spezifischen Produktivität des Modellproteins Lymphotoxin-beta-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein um Faktor 20 auf 0,5–11,5 pcd erzielt. Die Entwicklungszeit und der analytische Aufwand waren deutlich reduziert. Für einen weiteren Modellantikörper zeigte sich eine Verbesserung der Produktivität um Faktor 25 auf bis zu 8 pcd. Für Kulturen, die aus einer MTX-Genamplifikation hervorgegangen waren, konnte sogar eine Produktivitätssteigerung um Faktor 120 auf 42 pcd gezeigt werden.

Eine sehr ähnliche Anwendung der Markierung von Zielzellen unter niedrigen Temperaturen und anschließender Separation mittels MACS®-Technologie konnte bereits für Antikörperproduzierende Hybridomkulturen im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit erfolgreich gezeigt werden und resultierte in Produktivitätssteigerungen von bis zu Faktor 48 (Hoch, 2005).

Ein analog konstruiertes, sicherlich äußerst reizvolles Anreicherungssystem für Produzentenzellen konnte im vorliegenden Fall jedoch nicht erfolgreich angewendet werden (Machbarkeitsstudie nicht gezeigt). Auf CHO-Zellen konnten in Vorversuchen auch bei niedrigen Inkubationstemperaturen keine membranständigen Antikörper nachgewiesen werden, was möglicherweise auf unterschiedliche Protokolle zur enzymatischen Vereinzelung der Zellen zurückzuführen ist.

Daher wurde entschieden, ein System zur Anreicherung hum.IgG1-sezernierender Zellen in Anlehnung an das System des „Cytokine Secretion Assay“ (Miltenyi Biotec GmbH) zu entwickeln. Das „Antibody CHO Capture System“ basiert auf einer Markierung von CHO-Zellen mittels eines spezifischen anti-CHO.anti-hIgG-Antikörperkonjugats, welches die Immobilisation des sezernierten Produktes auf der Zelloberfläche vermittelt. Die Detektion erfolgt mittels eines Fluoreszenz-markierten anti-kappa-Antikörperkonjugats. Eine Anreicherung der so markierten Zellen ist mittels MACS®-Technologie über ein Microbead-Konjugat möglich, welches spezifisch das Fluoreszenz-Molekül erkennt. Die einzelnen Komponenten wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet und die einzusetzenden Titer bestimmt (2.7). Simulationen der Zielanwendung wurden unter Verwendung eines zu den Färbeansätzen gegebenen hIgG4-Antikörpers erfolgreich durchgeführt und bewiesen, dass die getesteten Konjugate zum Nachweis von in Lösung befindlichen humanisierten Antikörpern auch in niedrigen Konzentrationen bis 50 ng/mL genutzt werden können (2.7.5). Separationen über das MACS®-System waren für RMCE-generierte hum.IgG1-Produzentenklone jedoch nicht erfolgreich. Dies wurde auf die sehr niedrige spezifische Produktivität von unter 1 pcd zum Zeitpunkt der Analyse zurückgeführt. Es ist zu vermuten, dass in der Sekretionsphase nicht ausreichend Antikörper freigesetzt wurde, um eine

ausreichend quantitative Beladung der Fangmatrix zu erreichen, die eine Anreicherung der magnetisch markierten Produzenten ermöglicht hätte.

Obwohl die Anwendung des Systems im Rahmen der Arbeit nicht gezeigt werden konnte, ist aufgrund weiterer firmenintern durchgeführter Experimente bekannt, dass das „Antibody CHO Capture System“ für stabile hum.IgG1-Transfektanten, die einer Gen-Amplifikation unterzogen wurden und höhere spezifische Produktionsraten besaßen, erfolgreich angewendet werden konnte. Diese Versuche resultierten in einer messbaren Anreicherung von Produzenten aus der heterogenen Kultur (Meidhof, 2009). Basierend auf diesen Daten ist eine Erweiterung des „Antibody CHO Capture System“ zur Selektion von hochproduzierenden CHO-Zellen denkbar: Mittels einer Versuchsdurchführung unter limitierenden, nicht optimalen Kulturbedingungen stringent Hoch-Produzenten anzureichern. Dazu müssen die Verhältnisse der einzelnen Komponenten des „Antibody CHO Capture Systems“ für jedes Produzentengemisch so titriert werden, dass die Anwendung zur differenzierten Antikörper-Produzenten-Anreicherung möglich ist.

3.9 Ausblick

Basierend auf den Ergebnissen der vorgestellten Arbeit wird eine verbesserte Strategie zur Entwicklung von hoch-exprimierenden isogenen Basiszelllinien zur Verwendung von RMCE vorgeschlagen. Diese Strategie beinhaltet Erkenntnisse, die die unterschiedlichen Komponenten des RMCE-Konzepts und dessen Konstrukte betreffen.

Es ist bekannt, dass prokaryotische Sequenzen und besonders prokaryotische Selektionsmarker-Gene während der Zelllinienentwicklung zu unvorhersagbaren und nicht kontrollierbaren epigenetischen Modifikationen führen (Artelt *et al.*, 1991; Pham *et al.*, 1996). Alternativ dazu kann die Generierung stabiler Zelllinien auch unter Verwendung von Zellsortierungsmethoden, wie z.B. FACS-Sortierung (Kaufman *et al.*, 2008) oder der MACSelect™-Technologie (Gaines und Wojchowski, 1999; Philipps *et al.*, 2004) durchgeführt werden. Daher ist zu empfehlen, für weiterführende Strategien auf die Verwendung prokaryotischer Elemente zu verzichten, und eine alternative Selektionsstrategie für die Generierung stabiler Klone zu wählen. Eine Möglichkeit bietet dabei das in dieser Arbeit vorgestellte Selektionsprotein, welches eine Fusion aus EGFP und dem konstanten Bereich der schweren Maus-IgG1-Kette darstellt und aufgrund der vorgeschalteten Leader-Sequenz sezerniert wird (siehe 2.3.1 und Abbildung 2-5). Das dem Protein zugrunde liegende

Fusionsgen sollte als zentrales Element für ein optimiertes Selektionskonstrukt gewählt werden, da es neben der Produzentenselektion auch die Quantifizierung des Produktes auf intrazellulärer und extrazellulärer Ebene ermöglicht. Abweichend von dem in 2.3.1 und Abbildung 2-3 vorgestellten und für die Arbeit verwendeten Konstrukt wird jedoch die Verwendung einer „Promotor-Outside“-Strategie empfohlen. Qiao *et al.* (2009) zeigten, dass bei Anwendung einer Negativ-Selektion ein hohes Aufkommen an Klonen mit einer spontanen Resistenz gegen Ganciclovir auftrat, da das *hyg^r*-Gen in den entsprechenden Zellen durch „Silencing“ stillgelegt worden war. Kam es dann gleichzeitig zu einer zufälligen Integration des Austauschkonstruktes an einer anderen genomischen Lokation, was zu einer Expression des vom Austauschkonstrukt codierten Proteins führte, resultierte daraus die phänotypische Identifikation falsch-positiver Klone, was auch im Falle der hier vorliegenden Arbeit ein zentrales Problem darstellte. Durch die Verwendung einer „Promotor-Outside“-Strategie dagegen erreichten Qiao *et al.*, dass die falsch-positiven Klone auf phänotypischer Ebene als RMCE-negativ erschienen, was zu einer deutlichen Reduktion der anschließend zu untersuchenden Einzelklone führte.

Die Beibehaltung der flankierenden S/MAR-Elemente E und W wird ebenfalls dringend empfohlen, da ihre Eigenschaften zur Optimierung des Gen-Orts, der Expressions-Eigenschaften und Chromatin-Struktur in der Literatur mehrfach gezeigt wurden, wie von Bode *et al.* in Übersichtsartikeln zusammengefasst (2003a; 2003b).

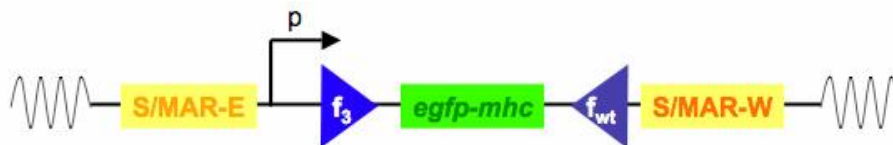


Abbildung 3-5: Optimiertes Selektionskonstrukt zur Generierung von isogenen Basiszelllinien zur Proteinproduktion. Das Konstrukt basiert auf den im Rahmen der Arbeit generierten und in der Literatur veröffentlichten Optimierungsvorschlägen. S/MAR-E und S/MAR-W=Scaffold/Matrix-Attachment-Regions; f_3 , f_{wt} =FRT-Erkennungsstellen („flippase-recognition-target“) der Flp-Rekombinase; p=Promotor; *egfp-mhc*=Fusionsgen aus *egfp* („enhanced green fluorescent protein“) und *mhc* (konstante Region einer schweren Maus-IgG1-Antikörperkette).

Das optimierte Selektionskonstrukt aus Abbildung 3-5 sollte zur Generierung von stabilen Einzelkopie-Klonen genutzt werden, da gezeigt werden konnte, dass die Verwendung von Mehrkopie-Klonen für RMCE-Experimente aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Kassettenaustauschs in mehreren Kopien nachteilig ist (2.5). Zu einer

Reduktion der Gen-Kopienzahl im Falle multipler Gen-Kopien an einem Gen-Ort unter Flp-Rekombinase-Expression kommt es nur, wenn es sich um „head-to-tail“-Integrate handelt (Bode *et al.*, 2000b; Oumard *et al.*, 2006). Elektroporations-Protokolle zur Generierung von Einzelkopie-Klonen wurden von Baer *et al.* (2001) entwickelt, d.h. Lipofektion und Calcium-Phosphat-Transfektion sind für diese Anwendung nicht geeignet. Eine Alternative zur Elektroporation stellt die virale Infektion unter Verwendung eines retroviralen Vektorsystems dar (Bode *et al.*, 2003b), mit dessen Hilfe eine hocheffiziente Einzelkopie-Integration von 90-100 % gezeigt werden konnte (Coroadinha *et al.*, 2006; Schucht *et al.*, 2006).

Die Selektion der auf einem dieser Wege generierten stabilen Transfektantenklone sollte für die vorgeschlagene Strategie aus den bereits erwähnten Gründen über das sezernierte Selektionsprotein EGFP-mHc erfolgen. Der Entwicklungsstand des im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mitentwickelten „CHO Antibody Capture Systems“ ist mittlerweile so weit fortgeschritten, dass die Methode zur Anreicherung von Produzentenzellen genutzt werden kann (persönliche Kommunikation mit Susanne Höher-Peters, Miltenyi Biotec GmbH). Die bevorzugte Anwendung des Systems zur gezielten Anreicherung von hoch-produzierenden Zellen könnte dabei möglicherweise nach weiteren Optimierungsschritten, d. h. vorrangig durch eine Steigerung der Sensitivität des Systems durch die Titrationen der Einzel-Komponenten, vorgenommen werden (3.8).

Die Verfeinerung der Selektionsstrategie beinhaltet somit folgende Aspekte:

- a) Eliminierung der Selektion über ein prokaryotisches Selektionsmarker-Gen zur Vermeidung von „Silencing“-Effekten.
- b) „Promotor-Outside“-Strategie zur Vermeidung der phänotypischen Identifikation falsch-positiver Klone.
- c) Selektion auf hoch-sekretorische Zellen mittels „CHO Antibody Capture System“; Verwendung des sezernierbaren EGFP-mHc Fusionsproteins zur Selektion auf Hochproduzenten, bei denen Sekretion nicht limitierend ist.

Um den analytischen Aufwand zur Identifikation von isogenen Basiszelllinien möglichst gering zu halten, wird weiterhin eine RMCE-Strategie empfohlen, bei der es durch Vor-Selektion auf einen hoch-exprimierten Integrationsort und die Zugänglichkeit für RMCE zu einer Reduktion der zu analysierenden Klone kommt, wobei bekannt ist, dass diese beiden Eigenschaften nicht zwangsläufig korrelieren (Vooijs *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse, die Qiao *et al.* in Hinblick auf RMCE-Strategien zur Generierung von Masterzell-Klonen veröffentlichten, zeigten deutlich, dass mindestens zwei aufeinander

folgende RMCE-Zyklen durchgeführt werden sollten, um RMCE-kompatible und hoch-exprimierende Klone zu etablieren. Die Selektion auf Hochproduzenten mittels intrazellulär vorliegendem GFP erwies sich dabei jedoch nicht als ausreichend stringent, da die generierten Klone trotz hoch-exprimierter Gen-Orte mit guter GFP-Expression nach RMCE das GOI nicht in der zu erwarteten Quantität sezernierten (persönliche Kommunikation mit J. Qiao, AG Prof. Jürgen Bode). Hierfür ist wahrscheinlich die Tatsache verantwortlich, dass die Sekretionsmaschinerie der Klone nicht die nötige Kapazität zur Sekretion entsprechender Mengen des synthetisierten Produktes aufwies.

Unter Zusammenführung der Erfahrungen aus diesen beiden Arbeiten ergibt sich folgende verbesserte RMCE-Strategie:

- 1) Stabile Einzelkopie-Transfektion mit einem Konstrukt, bei dem der Promotor außerhalb der *FRT*-Kassette positioniert ist („Promotor-Outside“-Konzept) und Vermeidung einer antibiotischen Selektion unter Verwendung des optimierten Selektionsproteins (sezernierbares EGFP-mHc).
- 2) Anreicherung von stabil transfizierten (Hoch-)Produzentenklonen mittels „CHO Antibody Capture System“.
- 3) RMCE I: Austausch des *egfp-mhc* gegen *hyg^rk* und anschließende Positivselektion.
- 4) RMCE II: Austausch des *hyg^rk* gegen *gfp* und Negativselektion mit Ganciclovir, sowie FACS-Sortierung auf GFP-positive Zellen.
- 5) RMCE III: Austausch des *gfp* gegen das GOI, FACS-Sortierung auf GFP-negative Zellen und Überprüfung der Expression. Im Falle von Antikörpern erneute Anreicherung RMCE-positiver Klone und Verifikation der Sekretion mittels ELISA.
- 6) Subklonierung zur Generierung von isogenen Basiszelllinien.

Das Ziel dieser optimierten RMCE-Strategie liegt darin, eine frühzeitige Beschränkung auf hoch-exprimierende und stabile, sekretorisch besonders befähigte Zellen vorzunehmen und solche Zellen aus der weiteren Analyse auszuschließen, die nicht RMCE-kompatibel sind.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Autoklav	Varioklav, H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
CellQuest Research Software	Becton-Dickinson (San José, Kalifornien, USA)
CO ₂ -Inkubator	Typ BB6620, Heraeus (Hanau)
Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene (Rochester, USA)
ELISA-Reader	Emax, Precision Microplate Reader, Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
FACS Calibur Software	Becton-Dickinson (San José, Kalifornien, USA)
Gelanalyse und -dokumentation	Gel Doc 1000 und Software Quantity One Version 4.3.1, BioRad (München)
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf (Hamburg)
Hybridisierungssofen	Model 1004 , Shel Lab (Cornelius, USA)
MACSQuant	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
MACSQuantify Software, Version 1.2.0922.R	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Mikroskop	Leica DMIL, Leica (Bensheim)
Mixer	MSI Minishaker, IKA (Taquara, Brasilien)
MS-Säule	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
NAP5-Säule	GE Healthcare (München)
Netzteil Elektrophorese	Power Supply PS 304, Gibco (Karlsruhe)
Neubauerkammer	Faust (Meckenheim)
PCR-Cycler	Mastercycler gradient, Eppendorf (Hamburg)
PD10-Säule	GE Healthcare (München)
pH-Meter	pH-Meter 765 Calimatic, Knick (Berlin)
Photometer	Ultraspec 3300 pro UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotec (Freiburg)
	NanoDrop ND-1000 und NanoDrop ND-1000 3.7.0 Software
QuadroMACS (Dauermagnet)	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Schüttelinkubator	Orbital Shake, Thermo Life Sciences (Engelsbach)
Sterile Werkbank	Typ UVF 6.12S, BDK Luft- und Reinraumtechnik (Genkingen)
Trockenbrutschrank	Function Line, Heraeus (Hanau)

UV-Tisch	Biometra TI2, Biometra (Göttingen)
Waagen	Typ A120S*-D1 und Typ LC2200-00V1, Sartorius (Göttingen)
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q, Millipore (Billerica, USA)
Wasserbad	Typ EC-5, Julabo (Seelbach)
Zentrifugen	Biofuge pico und Multifuge® 4KR, Heraeus (Hanau)

4.2 Material

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien werden nachfolgend unter Angabe der Bezugsquelle aufgelistet. Die Rezepturen der kommerziell erhältlichen Test-Kits sind den jeweiligen Produktinformationen zu entnehmen.

4.2.1 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
2'- deoxynucleoside-5'-triphosphates (Lithiumsalz)	Roche (Mannheim)
Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose (ultra pure)	Pharmacia (Freiburg)
Ampicillin, Natriumsalz	Serva (Heidelberg)
Anti-Digoxigenin-AP (750 U/mL)	Roche (Mannheim)
ATP (Adenosin-5'-Tri-Phosphat, di-Natriumsalz)	Roche (Mannheim)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Carbonat-Bicarbonat-Kapseln	Sigma (Deisenhofen)
CDP-Star (25 mM disodium 4-chloro-3-(4-methoxyspiro{ 1,2 dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl) phenyl phosphate)	Roche (Mannheim)
Digoxigenin-11-dUTP, alkali-labile	Roche (Mannheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt)
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Deisenhofen)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt)
DNA Molecular Weight Marker X DIG	Roche (Mannheim)

Material und Methoden

DNA-Längenstandard DNA ladder, 2 log, 0,1-10,0 kb	New England Biolabs (Frankfurt a. Main)
EDTA (Ethylen-Dinitrilo-Tetra-Acetat)	Merck (Darmstadt)
Erythrosin B (Dinatrium-2,4,5,7- tetraiodfluoresceinat)	Sigma (Deisenhofen)
Essigsäure/Eisessig	Sigma (Deisenhofen)
Ethanol	VWR (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
Fötale Kälberserum, Pharma Grade	PAA (Österreich)
Hygromycin B	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Kanamycin-Sulfat	Gibco (Karlsruhe)
L-Glutamin (200 mM; 29,2 mg/mL)	Gibco (Karlsruhe)
LipoTAXI	Stratagene (Niederlande)
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, 18x24	Roche (Mannheim)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
Metafectene	Biontex (Martinsried)
Natriumacetat (NaAc)	Merck (Darmstadt)
Natriumbicarbonat (7,5 %)	Gibco (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Natrium-Pyruvat	Sigma (Deisenhofen)
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma (Deisenhofen)
Neutralrot-Lösung (3,33 g/Liter)	Sigma (Deisenhofen)
Nylon-Membran, positiv geladen	Roche (Mannheim)
Oligonukleotide (100 pmol/μL, entsalzt)	Metabion (Martinsried)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U Penicillin und 10.000 mg/mL Streptomycin in 0.85% Saline	Gibco (Karlsruhe)
Pepton	Merck (Darmstadt)
Propidiumiodid	Sigma (Deisenhofen)
Puromycin-dihydrochlorid	Sigma (Deisenhofen)

R-Phycoerythrin (PE)	Far East Bio-Tec (Taipei City, Taiwan)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat)	Merck (Darmstadt)
Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexan-1-carboxylat (SMCC)	Sigma (Deisenhofen)
TMB ready to use ELISA substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)	Serva (Heidelberg)
Tris (Tris-Hydroxymethylaminomethan)	Roth (Karlsruhe)
Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02 %) in HEPES-gepufferter Saline	Gibco (Karlsruhe)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
Veggie Peptone	Novagen (Darmstadt)
Veggie Yeast Extract	Novagen (Darmstadt)

4.2.2 Verbrauchsmaterialien

ELISA-Platte Microlon (96-Napf)	Greiner Bio-One (Frickenhäusen)
Eppendorf-Caps	Starlab (Ahrensburg)
Falcons (50 mL, 15 mL)	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Filterpapier, 3 MM Whatman	Schleicher & Schuell (Dassel)
Hybridisierungsbeutel	Roche (Mannheim)
Kryoröhrchen	Nalgene Nunc (Rochester, USA)
Nylonmembran, positiv geladen	Roche (Mannheim)
PCR-Gefäße	Brand (Essex, England)
Petrischalen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten (2-100 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Polystyrol-Rundbodenröhrchen (FACS-Tube)	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Sephadex G25 Säule	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Zellkultur-Flaschen (25-175 cm ²)	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Zellkulturplatten (6- bis 96-Napf)	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)

4.2.3 Zellen

CHO-DG44-Zellen (serumunabhängig): Invitrogen, Kat.-Nr. 12609-012

CHO-DG44-Zellen (serumabhängig): Lawrence Chasin (Columbia University, USA)

CHO-K1-Zellen: Invitrogen, Kat.-Nr. 11619-012

CHO-Dukx-B11-Zellen: ATCC (American Type Culture Collection), ATCC-Nr. 9096

COS1-Zellen: DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), DSMZ-Nr. ACC63

4.2.4 Bakterien (*E. coli*)

Veggie™ NovaBlue Singles™ Competent Cells, Novagen (Darmstadt)

Stamm: K12

Genotyp: *endA1 hsdR17* ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA⁺B⁺ lac^qΔM15::Tn10] (Tet^R)*

4.2.5 Oligonukleotide und synthetisierte Fragmente

Nomenklatur	Zielfragment	Sequenz in 5' à 3' -Richtung
secrEGFP		GGTACCTTAATTAAATGGACATCCTGTGCTCCACCCTGCTGCTGCTGACCGTGCCTTCCTGGGTGCTGTCCGTGTCCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACCGGCGTGGTGCCTATCCTGGTGGAGCTGGACGGCGACGTGAACGGCCACAAGTTCTCCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCTGTGCCCTTGGCCTACCCTGGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCTCCAGATACCCTGACCACATGAAGCAGCACGATTTCTTCAAGTCCGCCATGCCTGAGGGCTACGTGCGAGAGCGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCAAGGGCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACACTGGTGAACCGGATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGATGGCAATATCCTGGGCCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACCTCCCAACGTTGTACATCATGGCCGACAAGCAGAAAAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGGCACAACTCGAGGACGGCTCCGTGCAGCTGGCCGACCACTACAGCAGAACACCCCTATCGGCGACGGCCCTGTGCTGCTGCCTGACAACCACTACCTGTCCACCCAGTCCGCCCTGTCCAAGGACCCTAACGAGAAGCGGGACCACATGGTGCTGCTGGAGTTCTGTGACCCGCTGGCATCACCCCTGGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCAGGTGAGTCCTCACAGTCGACGAGCTC
<i>HindIII</i> -f ₃ -MCS-f- <i>Nspl</i> Teil A	f ₃ -MCS-f für pEx	agcttGAAGTTTCCTATTCCGAAGTTTCCTATTCTTCAAATAGTATAGGAACCTTCggcgcgccAAAAAacgtacgAAAAAagc
<i>HindIII</i> -f ₃ -MCS-f- <i>Nspl</i> Teil B		tagcAAAAAaggtaccCTTCAAGGATATGAAAGATCTCTTATCCTTGAAGCCTTATCCTTGAAAGacatg
<i>HindIII</i> -f ₃ -MCS-f- <i>Nspl</i> Teil C		TCTTCAAGGATAAGGCTTCAAGGATAAGAGATCTTTTCATATCCTTGAAAGgtaccTTTTTTgcta
<i>HindIII</i> -f ₃ -MCS-f- <i>Nspl</i> Teil D		gcTTTTTTTcgtagcTTTTTTggcgcgccGAAGTTCTTATACTATTGAAGAATAGGAACCTTCGGAATAGGAACCTTca
F- <i>hcmv</i> -Sonde	<i>hcmv</i> -Promotor	GTTTGACTCACGGGGATTTC
R- <i>hcmv</i> -Sonde		GCCAGTTAAGCAGTGGGTTC
F- <i>hcmv</i> _Ascl		AAAAAagcgcgccCGATGTACGGGCCAGATATACGC
F- <i>hcmv</i> _BspWI		AAAAAacgtacgCGATGTACGGGCCAGATATACGC
R- <i>hcmv</i> _NotI		AAAAAagcgcgccAATTTGATAAGCCAGTTAAGC

F-secrEGFP-64	<i>egfp</i>	GTGAACGGCCACAAGTTCTC
R-secrEGFP-714		CTTGTCAGCTCGTCCATGC
F-S/MAR-E_ <i>NheI</i>	S/MAR-E	AAAAAAGCTAGCAATTCAGCAAGGTCGCCACG
R-S/MAR-E_ <i>NheI</i>		AAAAAAGCTAGCCTATCAAGATATTTAAAG
F- <i>neo</i> ^R -239	<i>neo</i> ^R	gctcgacgttgtcactgaag
R- <i>neo</i> ^R -684		aatatcacgggtagccaacg
F- <i>HygTk</i> _Ascl	<i>HygTk</i>	AAAAAAGcgcgcgccCCTGGAATGTTTCCACCCAATG
R- <i>HygTk</i> _NheI		AAAAAAGctagcGACCCCGTCCCTAACCCACGG
F-J00228-50		GGCTAAGGTGAGGCAGGTG
R-J00228-1959	<i>hum.IgG1-HC</i>	CGTGGAAGAACCATCACAG
R-J00228-1959_ <i>Bs</i> WI		AAAAAAGctagcCGTGGAAGAACCATCACAG
R-J00241-1195_ <i>NheI</i>	<i>hum.IgG1-LC</i>	AAAAAAGctagccttGAAAAATTGCCTTGTTG
F-pEx Analyse	pEx	ACCGTCTATCAGGGCGATGG
R-pEx Analyse		TATAGTCCTGTCGGTTTCG
F-J00453-10_ <i>SalI</i>	<i>mlgG1-HC</i>	AAAAAAGTCGACTgggaagggtgcaaaaagtag
R-J00453-1812_ <i>Bs</i> WI		AAAAAACGTACGatggagaccctcattccat

4.2.6 Vektoren

Die folgenden Vektoren wurden von den angegebenen Quellen bezogen oder hergestellt.

pFlpO-puro	Vektor, der für die Flp-Rekombinase kodiert, die einer Codon-Optimierung zur Expression in CHO-Zellen unterzogen wurde; erhalten von Prof. Jürgen Bode, AG EPI, HZI Braunschweig
pF3MCSF	Basis-Vektor für das RMCE Austauschkonstrukt; erhalten von Jürgen Bode, AG EPI, HZI Braunschweig
pHygTkfus	Vektor, der für ein Hygromycin-Thymidinkinase-Fusionsgen codiert; erhalten von Prof. Jürgen Bode, AG EPI, HZI Braunschweig
pSV2-neo	Klonierungsvektor mit einer Neomycin-Resistenz; ATCC, ATCC-Nr. 37149™
pSV2-neo-HCMV-mHc	Der Vektor basiert auf pSV2-neo. Über <i>EcoRI</i> und <i>Bam</i> HI wurde jedoch eine neue MCS eingebracht (<i>I-Sce</i> I, <i>Ascl</i> , <i>NheI</i> , <i>NotI</i> , <i>PacI</i> , <i>Pae</i> R7I, <i>Psh</i> AI <i>SalI</i> , <i>KpnI</i> , <i>Bs</i> WI), und der <i>hcmv</i> -Promotor mittels <i>Ascl</i> / <i>NotI</i> inseriert. Die konstante Region einer schweren <i>mlgG1</i> -Kette wurde über <i>SalI</i> / <i>Bs</i> WI kloniert (Busch, 2005 #148).
p2nd	Das synthetisch hergestellte sezernierbare EGFP wurde über <i>PacI</i> / <i>SalI</i> in den mit <i>PacI</i> / <i>SalI</i> geschnittenen und

	dephosphorylierten Vektor pSV2-neo-HCMV-mHc kloniert, gefolgt von der Insertion der PCR-generierten S/MAR-E über <i>Ascl</i> in pSV2-neo-hcmv-secrEGFP-mHc. Anschließend wurde die synthetisch hergestellte S/MAR-W über <i>BsWI</i> in pSV2-neo-S/MAR-E-hcmv-secrEGFP-mHc ligiert.
pf ₃ MCSf _i =pEx	Das aus vier Oligonukleotiden hybridisierte Insertionsfragment <i>HindIII</i> -f ₃ MCSf _i - <i>Nspl</i> wurde in den mit <i>HindIII</i> und <i>Nspl</i> verdauten und dephosphorylierten Vektor pF3MCSF ligiert.
pExAk	Die Klonierung der PCR-generierten humanisierten IgG1-Antikörperketten in pEx erfolgte in zwei aufeinander folgenden Schritten: Die schwere Kette wurde über <i>Ascl/BsWI</i> in das mit <i>Ascl/BsWI</i> verdaute Plasmid pEx kloniert (=pExHc). Darauf folgte die Klonierung der leichten Kette über <i>BsWI/NheI</i> in das mit <i>BsWI/NheI</i> verdaute Plasmid pExHc.
pExHygTk	Das PCR-generierte Hygromycin-Thymidinkinase-Fusionsgen wurde über <i>Ascl/NheI</i> in den mit <i>Ascl/NheI</i> geschnittenen Vektor pEx kloniert.

4.2.7 Enzyme

PicoMaxx High Fidelity PCR System (2,5 U/μL)	Stratagene (Niederlande)
Alkalische Phosphatase, Shrimp (1 U/μL)	Roche (Penzberg)
Restriktionsendonukleasen (5-20 U/μL)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Homing Endonuklease I-SceI (5 U/μL)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Proteinase K	Promega, Madison (Wisconsin, USA)
T4-DNA-Ligase (5 U/μL)	Roche (Penzberg)
Expand High Fidelity PCR System	Roche (Penzberg)
DNA Pol I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

4.2.8 Kits

EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche (Penzberg)
EndoFree DNA Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche (Penzberg)

Rapid DNA Ligation Kit	Roche (Penzberg)
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche (Penzberg)
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche (Penzberg)
Mouse Monoclonal Antibody Isotyping (IsoStrip)	Roche (Penzberg)

4.2.9 Antikörper und Antikörperkonjugate

Spezifität	Klon	Hersteller
mouse anti-human IgG	JDC-10	Beckman Coulter (Fullerton, USA)
mouse anti-human kappa.HRP	HP6062	Southern Biotec (Birmingham, USA)
goat anti-mouse IgG, H&L chain specific Peroxidase Conjugate		Calbiochem (Darmstadt)
goat anti-mouse IgG, H&L chain specific		Calbiochem (Darmstadt)
Maus anti-Human IgG	JH2-4F5.20.1.PE JH2-18B10.10.2	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Maus anti-CHO	HA3-5D4.2 HA3-9H11.5 HA3-16C1.2 HA321E10.4 HA3-21F5.6 HA3-21E2.1 HA3-10D10.4	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Maus anti-Human Igkappa.PE	IS11-1G4.1.4.PE IS11-24D5.17.4.PE JH1-11G11.54.12.PE	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Ratte anti-Maus IgG1.PE	X-56	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Ratte anti-Maus IgG2b.PE	X-57	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Tysabri (Natalizumab), anti- Human IgG4		Biogen Idec GmbH

chim. anti-TNFalpha	Essex	Pharma
	(München)	
Chim. IgG4	Miltenyi Biotec GmbH	
	(Bergisch Gladbach)	

4.2.10 Medien und Puffer für zellbiologische Methoden

DMEM , Dulbecco's Modification of Eagles Medium (für COS1-Zellen)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
---	---

DMEM 10% FCS	DMEM 10 % (v/v) FCS
---------------------	------------------------

DMEM 20% FCS	DMEM 20 % (v/v) FCS
---------------------	------------------------

Ham's F12 (für serumabhängige CHO-DG44-Zellen)	Gibco, Karlsruhe
--	------------------

Ham's F12 10% FCS	Ham's F12 10 % (v/v) FCS
--------------------------	-----------------------------

CD DG44 (für serumfreie CHO-DG44-Zellen)	Gibco, Karlsruhe 40 mM L-Glutamin
--	--------------------------------------

Einfriermedium	Kultivierungsmedium 10 % (v/v) DMSO
-----------------------	--

PBS (Phosphat-Buffered Saline)	137 mM NaCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 2,6 mM KCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄
---------------------------------------	--

PBS 2mM EDTA	PBS 2 mM EDTA
---------------------	------------------

PEB (PBS/EDTA/BSA)

PBS
0,5 % (w/v) BSA
2 mM EDTA

Trypsin 0,5% EDTA

Gibco (Karlsruhe)

5 x PE-Kopplungspuffer, pH 6,8

14,6 g NaCl
71,0 g Na₂HPO₄
10 mL 0,5 M EDTA

ad 1 Liter dH₂O

4.2.11 Medien und Puffer für molekularbiologische Methoden

VLB-Medium

Veggie Peptone	10 g
Veggie Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
	<hr/> ad 1 Liter dH ₂ O, autoklavieren

VLB-Agar

LB-Medium	98,5 % (v/v)
Agar	1,5 % (w/v)
	autoklavieren

50 x TAE-Puffer

Tris	2 M
Eisessig	2 M
0,5 M EDTA (pH 8,0)	50 mM

6 x Bromphenolblau Probenpuffer

50 x TAE	6 x TAE
Bromphenolblau	0,24 % (w/v)
Glycerin	30 %

Material und Methoden

6 x Xylencyanolblau Probenpuffer	50 x TAE	6 x TAE
	Xylencyanolblau	0,24 % (w/v)
	Glycerin	30 %
TE-Puffer (pH 8,0)	Tris/HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
Lysispuffer (pH 7,5)	Tris/Hcl	10 mM
	EDTA	10 mM
	NaCl	10 mM
	SDS	0,5 %
	Proteinase K (vor Gebrauch zugeben)	1 mg/mL

4.2.12 Puffer für biochemische Methoden

20 x SSC (pH 7,0)	NaCl	3 M
	Na-Citrat	300 mM
2 x SSC	20 x SSC	10 % (v/v)
10 M NaOH	NaOH	
0,4 M NaOH	10 M NaOH	25 % (v/v)
Denaturierungslösung	NaOH	0,5 N
	NaCl	1,5 M
Neutralisierungslösung (pH 7,5)	Tris/HCl	0,5 M
	NaCl	3 M
Prähybridisierungslösung	DIG Easy Hyb Granules lösen in 64 mL dH ₂ O	
Hybridisierungslösung	Prähybridisierungslösung	10 mL
	DIG-markierte Sonde aus PCR-Ansatz	4 µL

Low stringency wash buffer	20 x SSC 10 % SDS	2 x 0,1 % (v/v)
High stringency wash buffer	20 x SSC 10 % SDS	0,5 x 0,1 % (v/v)
Assay-Puffer	1 x PBS 1 % BSA (w/v)	
Waschpuffer	1x PBS 0,05% Tween 20	
Beschichtungspuffer	2 Kapseln in 100 mL dH ₂ O lösen	

4.2.13 EDV

Die Texte und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit den Programmen Microsoft Word, Excel und Power Point (Microsoft) sowie Prism 4.0c (GraphPad Software Inc.) erstellt. Zur Literaturrecherche diente PubMed, die Literaturverwaltung erfolgte unter Verwendung von EndNote X (Thomson).

Zur Durchführung von Restriktionskartierungen und Sequenzanalysen wurden die Programme DNA Strider 1.4f14 (CEA) und BlastN verwendet.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheit

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm (UV-Strahlung). Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches die Absorption dieser Strahlung proportional zur Konzentration der Nukleinsäuren. Die Proben wurden mit dH₂O verdünnt und ihre Nettoabsorptionen gegen dH₂O gemessen. Es gelten folgende Näherungswerte:

Oligonukleotide:	OD _{260 nm} =1~20 µg/mL
einzelsträngige DNA:	OD _{260 nm} =1~40 µg/mL

doppelsträngige DNA: $OD_{260\text{ nm}}=1\sim 50\text{ }\mu\text{g/mL}$

Proteine absorbieren ebenfalls bei 260 nm, ihr Absorptionsmaximum liegt allerdings bei 280 nm. Die Quotientenbildung aus $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ erlaubt eine Einschätzung des Reinheitsgrades der Nukleinsäuren. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 deutet auf reine DNA hin.

4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine wirksame Methode, um kurze Genomsegmente direkt zu amplifizieren. Sie umfasst mehrere Zyklen, in denen die DNA-Matrize denaturiert, die Oligonukleotide mit den komplementären Sequenzen des Zielsegmentes hybridisieren und die DNA-Polymerase ausgehend vom 3'-OH-Ende der Oligonukleotide Einzelstränge synthetisiert. Verwendet wurde eine Mischung aus den thermostabilen *Taq* und *Pfu* DNA Polymerasen (PicoMaxx, Stratagene). Die *Taq* Polymerase stammt aus *Thermus aquaticus* und arbeitet mit einer Fehlerrate von $2,2\times 10^{-5}$, die weitaus genauere *Pfu* Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* mit einer Fehlerrate von $1,3\times 10^{-6}$.

Reaktionsansatz:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x PCR-Puffer	5 μL	1 x
dNTP-Mix	2,5 μL	200 mM pro Nukleotid
Sense Primer	1 μL	200 pmol/mL
Antisense Primer	1 μL	200 pmol/mL
DNA-Matrize	0,5-5 μL	0,2-2 $\mu\text{g/mL}$
DNA-Polymerase (2,5 U/(IArgos et al.)	0,5 μL	50 U/mL
steriles dH ₂ O	ad 50 μL	

Zyklusparameter:

<i>Denaturierung</i>	98 °C	30 Sek.	
<i>Denaturierung</i>	94 °C	10 Sek.	
<i>Hybridisierung</i>	x °C	30 Sek.	30 x
<i>Elongation</i>	72 °C	1 Min./kb	
	72 °C	10 Min.	
	4 °C	¥	

Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide ergibt sich aus der Sequenz, die komplementär zu der des Zielfragmentes ist. Für dAMP und dTMP werden jeweils 2 °C, für dCMP und dGMP jeweils 4 °C berechnet. Durch Subtraktion von 5 °C berechnet sich daraus die für das Oligonukleotid spezifische Hybridisierungstemperatur.

Nach Ablauf der Reaktion wurden die PCR-Fragmente gereinigt (4.3.3) und durch analytische Agarose-Gelelektrophorese (4.3.4) auf Größe und Reinheit überprüft.

4.3.3 Reinigung von PCR-Fragmenten

Der High Pure PCR Product Purification Kit ermöglicht die Abtrennung einzel- und doppelsträngiger PCR-Produkte zwischen 100 bp und 10 kb von Oligonukleotiden, Nukleotiden, dimerisierten Primern, Proteinen und Salzen unter Verwendung einer Silikamatrix. Durch chaotrope Reagenzien (z.B. Guanidin-Thiocyanat) wird die Hydrathülle der DNA eliminiert und deren Adsorption an Glas- oder Silikaoberflächen (Birnboim und Doly, 1979; Vogelstein und Gillespie, 1979) in Gegenwart hoher Salzkonzentration favorisiert. Puffer niedriger Salzkonzentration (10 mM Tris) eluieren die Nukleinsäuren wieder vom Säulenmaterial. Der PCR-Ansatz wurde entsprechend der Produktinformation aufgereinigt und die DNA mit 30 µL 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) eluiert.

4.3.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Agarose-Gelelektrophorese nutzt das Laufverhalten geladener Moleküle im elektrischen Feld und trennt diese ihrer Größe entsprechend auf. Negativ geladene DNA-Moleküle wandern zum positiven Pol (Anode). Daraus resultiert ein spezifisches Bandenmuster, anhand dessen man Restriktionsverdaus und PCR-Reaktionen analysieren, aber auch bestimmte DNA-Fragmente zur weiteren Verwendung zurückgewinnen kann (4.3.6). Die Konzentration der Agarose ergab sich aus der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente

und die elektrophoretische Auftrennung wurde mittels Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Um ein Agarose-Flachbettgel zu gießen, wurde die Agarose in 1 x TAE Laufpuffer in der Mikrowelle aufgekocht, Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,5 µg/mL) zugegeben und die Lösung bei eingehängtem Kamm gegossen. Das erstarrte Gel wurde in die mit Laufpuffer befüllte Gelkammer eingesetzt, die Proben mit 6 x Probenpuffer versetzt und bei 60 bis 120 V aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte digital unter UV-Licht.

4.3.5 Verdau doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Reaktionen wurden die vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffer mit bestimmten Salzkonzentrationen und pH-Werten verwendet. Informationen bezüglich der Restriktionsendonukleasen (Inkubations-, Inaktivierungstemperaturen, Staraktivitäten, Pufferadditive etc.) wurden den Produktkatalogen entnommen.

Analytischer Restriktionsansatz:

Komponenten	Menge/Volumen
<i>DNA</i>	<i>0,5-1 µg</i>
<i>10x Inkubationspuffer</i>	<i>1 µl</i>
<i>Restriktionsendonuklease</i>	<i>3 U</i>
<i>dH₂O</i>	<i>ad 10 µl</i>

Der Reaktionsansatz wurde für 1Std. bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und anschließend im analytischen Agarosegel (4.3.4) aufgetrennt. Präparative Ansätze enthielten 2 bis 3 µg Plasmid-DNA und 0,5-1 µg PCR-Fragment mit 30 U Enzym und den Reaktionspuffern in einem Reaktionsvolumen von 30 bis 40 µL und wurden für 2-3 Std. inkubiert. Um genomische DNA präparativ zu verdauen, wurden 10 µg DNA in 15 µL mit 30 U Enzym verdaut. Um eine effiziente Reaktion zu erreichen wurde ein Teil des Enzyms nach der Hälfte der Reaktionszeit zum Ansatz pipettiert. Die DNA wurde im Agarose-Gel (4.3.4) aufgetrennt und mittels Gelextraktion (4.3.6) oder PCR-Reinigung (4.3.3) isoliert.

4.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt wurden, konnten unter langwelligem UV-Licht (360 nm) mit einem sterilen Skalpell zügig ausgeschnitten werden. Die DNA wurde mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kit nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Aufreinigung basiert auf der Immobilisierung von DNA an eine Silikamembran unter hohen Salzkonzentrationen und Elution mit niedriger Salzkonzentration (30 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5).

4.3.7 Dephosphorylierung

Eine unerwünschte Konkurrenzreaktion zur Ligation von Plasmid-DNA und Insertionsfragment stellt die Religation von linearisierten oder nicht quantitativ doppelverdauten Plasmiden dar. Die Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) erkennt sowohl DNA als auch RNA als Substrat und katalysiert die Dephosphorylierung des 5'-Phosphates, so dass diese Vektor-Moleküle nur mit Fragmenten ligiert werden, die 5'-Phosphate mit in die Reaktion einbringen. Daher wurde nach dem präparativen Restriktionsverdau der gesamte Reaktionsansatz mit Shrimp alkalischer Phosphatase (0,5 U) behandelt. Die Dephosphorylierung erfolgte in 10 Min. bei 37 °C unter Zugabe von 10x Reaktionspuffer und wurde durch Inkubation von 20 Min. bei 65 °C inaktiviert. Die DNA konnte direkt in die Ligation (4.3.9) eingesetzt werden.

4.3.8 Generierung von Insertionsfragmenten durch Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Generierung von Insertionsfragmenten für die Ligation wurden komplementäre Oligonukleotide so konstruiert, dass sie nach Hybridisierung die Charakteristika eines mit Restriktionsendonukleasen verdauten Fragmentes aufwiesen und demnach mit einem entsprechend vorbereiteten Plasmid ligiert werden konnten.

Zur Hybridisierung wurden je 10 µL der Oligonukleotide mit 2,5 µL 10x PCR-Puffer und 2,5 µL dH₂O in einem Reaktionsvolumen von 25 µL in einem auf über 95 °C vorgeheizten Wasserbad bis zur Abkühlung inkubiert und mittels Ethanolfällung (4.3.13) für die Ligation vorbereitet.

4.3.9 Ligation

Die T4 DNA-Ligase rekonstruiert die kovalente Bindung zwischen Vektor- und Insertionsfragment-DNA. Entweder bilden die überhängenden Enden des Vektors und des Insertionsfragmentes durch komplementäre Basenpaarung ein rekombinantes Plasmid, oder die Ligase verknüpft direkt Fragmente mit glatten Enden. Entscheidend für die Reaktionseffizienz ist neben einem geringen Reaktionsvolumen und einer hochkonzentrierten Ligase auch das molare Verhältnis aus Vektor und Insertionsfragment von 1:3 bis 1:10. Für problematische Ligationen war es sinnvoll, den Reaktionsansatz vor Zugabe der Ligase für 5 Min. bei 45 °C zu inkubieren, um Sekundärstrukturen der DNA zu vermeiden. Die Ligationseffizienz konnte durch Ligation linearisierten Plasmids ohne Insertionsfragment bestimmt werden, die Religationskontrolle diente als Maß für die Effizienz der Dephosphorylierung (4.3.7) bzw. gab Aufschluss über zu erwartende falsch positive Klone in den Ligationsansätzen. Zur Ligation wurden entweder das T4-Ligase Kit oder das Rapid DNA Ligation Kit (beides Roche, Mannheim) den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

4.3.10 Kultivierung kompetenter *E. coli*-Bakterien

4.3.10.1 Herstellung von Kulturmedien

VLB-Medium wurde entsprechend des auf dem Plasmid vorliegenden Resistenzgens mit 1/1000 Volumen Ampicillin oder Kanamycin (jeweils 50 mg/mL in aqua dest.) versetzt.

4.3.10.2 Herstellung von Agarplatten

VLB-Agar wurde nach dem Autoklavieren entweder direkt weiter verarbeitet oder aber nach Erstarren und Lagerung durch Aufkochen im Mikrowellengerät wieder verflüssigt. Je nach Resistenzgen wurde 1/1000 Volumen Ampicillin oder Kanamycin (50 mg/mL in aqua dest.) zugegeben. Es wurde je ca. 20 mL der Lösung in je eine 100 mm Plastik-Petrischale gegossen und nach Erstarren bei 2-8 °C gelagert.

4.3.10.3 Transformation von Bakterien

Der Ligationsansatz (maximal 1/10 des Bakterienvolumens) oder 1-5 ng einer Plasmidlösung wurden durch Antippen mit den kompetenten Zellen gemischt und der Ansatz für 5 Min. auf Eis inkubiert. Der Temperaturschock erfolgte für genau 30 Sek. auf 42 °C im vorgeheizten Wasserbad, danach wurden die Bakterien wieder für 2 Min. auf Eis inkubiert und dann mit Veggies SOC Medium versetzt. Im Falle einer Ampicillin-Resistenz wurden die Zellen sofort, im Falle der Kanamycin-Resistenz nach einer Inkubation von 30 min. bei 37 °C und 250 rpm auf trockenen Agarplatten (4.3.10.2) mit entsprechendem Antibiotikum mit einem Drigalsky-Spatel ausplattiert und ÜN bei 37 °C bebrütet. Lagerung der bewachsenen, mit Parafilm verschlossenen Agarplatten war bei 4 °C über mehrere Tage möglich.

4.3.10.4 Übernachtskulturen (ÜNK)

Eine einzelne von einem Ausstrich auf einer Agarplatte (4.3.10.3) gepickte Kolonie wurde in 5 mL VLB-Medium (4.3.10.1) mit 50 µg/mL des entsprechenden Antibiotikums inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Kolben mit fünffachem Kulturvolumen im Schüttelinkubator bebrütet. Lagerung der Kulturen war bei 4 °C über mehrere Tage möglich.

4.3.11 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Plasmid-DNA-Isolierung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien (Birnboim und Doly, 1979) und der Adsorption von DNA an Silikamembranen (kleiner Maßstab: High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche) oder Anionenaustauscher-Säulen (großer Maßstab: EndoFree Plasmid Maxi Kit, Qiagen) in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie, 1979). Die Elution erfolgte unter Niedrigsalzbedingungen. Die Präparationen wurden entsprechend den Instruktionen der Handbücher durchgeführt.

4.3.12 Gewinnung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Um die hochmolekulare oder genomische DNA aus eukaryotischen Zellen zu gewinnen wurden diese pelletiert (100 x g, 10 Min.), der Zellkulturüberstand verworfen und das Pellet entweder bei -20 °C für einige Tage gelagert oder sofort über Nacht bei 56 °C in Lysepuffer lysiert. Am nächsten Tag erfolgte Fällung der DNA durch Zugabe von Ethanol-Salzlösung (10 mL 100% EtOH + 150 µL 5 M NaCl) und eine Inkubation von 1 Std. bei RT. Das Präzipitat wurde dann bei ca. 12.000 x g und 4 °C für 20 Min. pelletiert, der Überstand

verworfen und das Pellet noch zweimal mit eiskalten 70%igem EtOH gewaschen. Der Überstand wurde soweit wie möglich entfernt und die pelletierte DNA getrocknet. Dann wurden zunächst 15 µL TE-Puffer zugegeben und ÜN bei 4 °C zum Lösen inkubiert. Wichtig war es, die DNA nicht durch Scherkräfte zu zerstören, daher durfte nur möglichst vorsichtig gemischt werden. Am nächsten Tag wurde die Konzentration der DNA-Lösung photometrisch bestimmt (4.3.1) und auf 1 µg/mL eingestellt.

4.3.13 Präzipitation von DNA mit Ethanol

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc-Lösung (pH 4,6) sowie dem 2,5fachen Volumen Ethanol gemischt und für 10 Min. im Ethanol-Trockeneisbad, 20 Min. bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C inkubiert. Präzipitate wurden 20 min. bei 12.000 x g sedimentiert, mit 70%igem, eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (10-15 Min., 12.000 x g). Nach Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Pellet getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit wurden photometrisch bestimmt (4.3.1).

4.4 Zellkulturmethoden

4.4.1 Kultivierung von Zellen

Eine Stammhaltung wurde angesetzt, um eine ständige Verfügbarkeit von Zellen zu gewährleisten. Die Kulturen wurden in Zellkultur-Flaschen (T25 oder T75) mit Filterdeckeln im nassbegasten Inkubator bei 37 °C mit 9 % CO₂ kultiviert. Dabei wurden die Suspensionszellen in der Regel auf einer Lebendzellzahl zwischen $2,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ Zellen pro mL gehalten. Für die adhärenenten Zellen wurde das Medium alle zwei bis fünf Tage gewechselt, vor Erreichen der Konfluenz wurden die Kulturen passagiert.

4.4.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Zählkammer (Neubauerkammer) im Lichtmikroskop. Bei der mikroskopischen Zählung wurden die Zellen in einem durch die Zählkammer definierten Volumen ausgezählt. Die Neubauerkammer besteht aus zwei Zählkammern mit jeweils vier Großquadraten. Jedes Großquadrat hat ein Volumen von

0,1 µL. Um den Fehler bei der Zählung möglichst gering zu halten, wurden die Proben so verdünnt, dass pro Großquadrat ca. 20-50 Zellen gezählt werden konnten. Die Zellkonzentration ergab sich unter Einbeziehung der Verdünnung und der ausgezählten Großquadrate zu:

$$c_v = \frac{n_v \cdot F}{G} \cdot 10^4$$

Gleichung 4-1: Berechnung der Zellkonzentration c_v [1/mL] (nach Lindl, 2002). n_v =Anzahl der (lebenden) Zellen; F=Verdünnungsfaktor; G=Anzahl der Großquadrate.

Um die Lebendzellzahl zu bestimmen, mussten lebende von toten Zellen unterschieden werden. Dazu wurde eine Färbung mit Erythrosin B vorgenommen. Es färbt das Cytosol toter Zellen rot an, da die Zellmembran dieser Zellen für den Farbstoff permeabel ist. Lebende Zellen bleiben farblos, da ihre Zellmembran intakt ist und den Farbstoff ausschließt.

Die Vitalität der Zellen lässt sich durch folgende Formel berechnen:

$$\text{Vitalität} = \frac{n_{\text{vital}}}{n_{\text{gesamt}}} \cdot 100$$

Gleichung 4-2: Berechnung der Vitalität [%] (nach Lindl, 2002). n_{vital} =Lebendzellzahl; n_{gesamt} =Gesamtzellzahl.

4.4.3 Passagieren

Das Medium der zu passagierenden adhärennten Zellen wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit einem dünnen Film PBS/EDTA überschichtet. Nach einigen Minuten (mikroskopische Kontrolle) lösten sich die Zellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes. Die Zellsuspension wurde zur Inaktivierung des EDTA in mindestens der doppelten Menge serumhaltigen Mediums aufgenommen und der Boden des Kulturgefäßes mit Hilfe einer Pipette abgespült. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde gezählt und die Zellen in der gewünschten Konzentration in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium ausgesät. Suspensionszellen wurden so mit frischem Medium verdünnt, dass sie Lebendzellzahlen zwischen $2,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ Zellen pro mL aufwiesen und somit in der logarithmischen Wachstumsphase verblieben (Jackson, 1993).

4.4.4 Langzeitlagerung von Zellen

Die Lebendzellzahl logarithmisch wachsender Zellen wurde bestimmt. Die Zellsuspension mit 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen wurde zentrifugiert (10 Min. bei 100 x g). Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 1 mL Einfriermedium (Kulturmedium mit 10 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wurde sofort in einem Cryo 1 °C Freezing Container (Nalgene) mit einer definierten Einfrierrate von 1 °C pro Min. auf -70 °C gelagert und konnte nach 12 Std. in flüssigen Stickstoff überführt werden. Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen. Das Einfrierröhrchen wurde bei 37° C im Wasserbad unter Schwenken aufgetaut, die Suspension in 10 mL Kulturmedium überführt und die Zellen in 10 Min. bei 100 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Kulturmedium resuspendiert und in ein der Zellzahl entsprechendes Volumen in einer Kulturflasche überführt.

4.4.5 Gentransfermethoden

4.4.5.1 Transfektion mittels LipiTAXI Reagenz zur transienten Testexpression in COS1-Zellen

COS1 Zellen wurden standardmäßig genutzt, um klonierte Antikörpergene transient zu exprimieren, und diese später im ELISA und Funktionalitätstest auf erfolgreiche Expression, Faltung und Sekretion zu untersuchen. Die Zellen wurden dazu am Vortag der Transfektion mit einer Lebendzellzahl von 8×10^5 in 5 mL in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde der Lipofektionsansatz aus 10 µg Plasmidlösung, 50 µL LipiTAXI Reagenz und 900 µL serumfreiem Medium für 15-30 min. zur Bildung der DNA-Lipidkomplexe inkubiert, mit 1,5 mL serumfreiem Medium aufgefüllt und dann tropfenweise auf die vorher von Medium befreiten Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4-6 Std. wurden dann 2,5 mL Kulturmedium mit 20 % FCS zugegeben, um ein Kulturmedium mit 10 % FCS wiederherzustellen. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium vollständig ausgetauscht. Am fünften Tag nach der Transfektion wurde der Kulturüberstand sterilfiltriert (0,45 µM) und die sezernierten Antikörper analysiert.

4.4.5.2 Transfektion mittels Elektroporation

Die Zellen sollten so vorbereitet werden, dass sie sich am Tag der Elektroporation in der logarithmischen Wachstumsphase befanden und eine hohe Vitalität aufwiesen. Zur

Generierung stabiler Transfektanten wurde ausschließlich durch präparativen Restriktionsverdau (4.3.5) linearisiertes und per PCR-Purification Kit aufgereinigtes Plasmid aus EndoFree DNA Maxi Präparationen (4.3.11) transfiziert. Pro Ansatz wurde die entsprechende DNA-Menge in 250 µL 1x PBS in 4 mm Elektroporationsküvetten vorgelegt. Die 2×10^6 Zellen wurden nach Ernte gut vereinzelt und einmal in sterilem PBS/EDTA gewaschen (100 x g, 10 Min.). Dann wurde das Pellet in 250 µL 1x PBS resuspendiert und die Suspension zu der vorgelegten Plasmidlösung pipettiert. Nach Mischen durch Antippen erfolgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis, gefolgt von der Elektroporation bei 230 V und 550 µF im BioRad GenePulser. Anschließend wurde der Ansatz für weitere 10 Min. auf Eis inkubiert (Potter *et al.*, 1984), in 5 mL Kulturmedium aufgenommen und in eine 100 mm Kulturschale oder in eine Kulturflasche ausgesät. Zur Vereinzelung der Zellen wurden direkt im Anschluss 1/10 und 1/100 Verdünnungen in weiteren Kulturschalen hergestellt. Nach 24-72 Std. erfolgte dann die Selektion (4.4.6).

4.4.6 Selektion

Je nach Zelllinie, Transfektionsmethode, Plasmid und Selektionsmittel wurde das Kulturmedium 24 bis 72 Std. nach der Transfektion gewechselt und die Zellen mit Selektionsmedium versetzt, welches während des Selektionsprozesses ein- bis zweimal pro Woche gewechselt wurde. Klone wurden je nach Selektion und Zelltyp 14-21 Tage später makroskopisch sichtbar und, wenn sie ungefähr Stecknadelkopfgröße erreicht hatten, isoliert und zur weiteren Verwendung expandiert.

Die zur Selektion verwendeten Wirkstoffkonzentrationen sind zelltypabhängig und mussten vorher durch Titration und Vitalitätsbestimmung ausgetestet werden.

4.4.7 Subklonierung mittels Endpunktverdünnung

Zur Generierung von Einzelklonen, die eine Population aus genetisch identischen Zellen darstellen sollen, wurden Mischkulturen z.B. nach Transfektion (4.4.5) oder RMCE (4.4.9) per Endpunktverdünnung subkloniert. Dabei wurde die Zellzahl der gut vereinzelt Zellen bestimmt (4.4.2) und mit entsprechendem Kulturmedium auf eine theoretische Zellkonzentration von drei bis zehn Zellen pro mL verdünnt. Die Zellsuspension wurde dann mit 100 µL je Napf in 96-Napf Zellkultur-Rundbodenplatten ausgesät, was einer Verteilung von 0,3 bis 1 Zelle pro Napf entspricht (also einer Zelle in jedem dritten bis jedem Napf) und

für ungefähr 14 Tage bei 37 °C und 9 % CO₂ inkubiert. Nach einem bis zwei Tagen konnte die erfolgreiche Aussaat der Zellen mittels mikroskopischer Kontrolle festgestellt werden.

4.4.8 Spezifische Produktionsrate

Die spezifische Produktionsrate wurde bestimmt, indem zum Zeitpunkt t_1 $2,0 \times 10^5$ vitale Zellen/mL (x_1) aus der logarithmischen Wachstumsphase der Kultur in eine Zellkulturflasche in frisches Medium eingesät wurden ($P_1=0$). Nach 48 Std. (t_2) wurde 1 mL Überstand entnommen und bei -20 °C gelagert, die vitale Zellzahl (x_2) mittels Neubauerkammer erhoben (4.4.2). Die Antikörperkonzentration des Überstandes (P_2) wurde mittels ELISA (4.5.1) bestimmt und die spezifische Produktionsrate q mit folgender Formel ermittelt (Gleichung 4-3):

$$q = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} \cdot \frac{1}{\left[\frac{x_2 - x_1}{\ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right)} \right]} \cdot 24 \cdot 10^6$$

Gleichung 4-3: Berechnung der spezifischen Produktionsrate q [$\mu\text{g mAk}/1 \times 10^6$ Zellen/24 Std.] [21].

t_1 =Startzeitpunkt der Messung; t_2 =Endzeitpunkt der Messung; P_1 =absolute Antikörper-Produktion zu t_1 ; P_2 =absolute Antikörper-Produktion zu t_2 ; x_1 =Zellzahl/mL zu t_1 ; x_2 =Zellzahl/mL zu t_2 .

4.4.9 RMCE

Der Rekombinase-vermittelte Kassettenaustausch basiert auf einer Co-Transfektion von zwei Plasmiden mittels Lipofektion. Einen Tag vor der Transfektion wurden $1,5 \times 10^5$ lebende Zellen in eine 6-Napf Zellkulturplatte ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde zunächst das Kulturmedium erneuert und nach 4 Std. die Lipofektion durchgeführt. Dazu wurden zum Einen 3 μL des Austauschplasmids pEx und 1 μL des Flp-Rekombinaseplasmids pFlpO-puro mit 100 μL serumfreiem Medium gemischt, zum Anderen 30 μL des Lipofektionsreagenz Metafectene mit ebenfalls 100 μL Medium. Beide Lösungen wurden im Anschluss vereinigt und nach 15-minütiger Inkubation bei RT zu den Kulturen gegeben. Nach 24 Std. wurde der Kulturüberstand mit den Lipofektionsreagenzien entfernt und durch Kulturmedium mit 2,5 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin ersetzt, welches dann 48 Std. nach der Transfektion durch Kulturmedium ersetzt wurde.

Im Falle der Selektion durch Hygromycin B wurde der Selektionsdruck sieben Tage nach der Transfektion appliziert.

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 Antikörper-Isotypisierung mittels IsoStrip

Der verwendete Isotypisierungskit (Roche) besteht aus blauen Latexpartikeln, die an anti-mIgkappa Antikörper sowie anti-mIglambda Antikörper gekoppelt sind, und einem Isotypisierungstreifen. Dieser Streifen beinhaltet Abschnitte, in denen unterschiedliche Antikörper immobilisiert sind, die gegen murines IgG1, IgG2a/b, IgG3, IgM und IgA sowie gegen die murine Kappa- und Lambda-Kette gerichtet sind. Wird nun die zu analysierende Probe mit den Latexpartikeln inkubiert, bindet diese an die gekoppelten anti-mIgkappa oder anti-mIglambda Antikörperpartikel unabhängig vom Isotyp des zu analysierenden Antikörpers. Wird nun der Isotypisierungstreifen in die Lösung gehalten, so wird diese – und mit ihr die darin enthaltenen Antikörper inklusive der Latexpartikel - in den Streifen gesogen. Je nach Isotyp des zu analysierenden Antikörpers werden die Latexpartikel mit dem gebundenen Antikörper von dem im Isotypisierungstreifen immobilisierten Antikörper gebunden. Die Latexpartikel werden somit festgehalten und können nicht weiter durch den Streifen wandern. An der entsprechenden Stelle bildet sich dadurch eine blaue Bande und der Isotyp kann abgelesen werden.

Um den Isotyp des rekombinanten Antikörpers zu kontrollieren, wurden 150 µL Zellkulturüberstand in ein Reaktionsröhrchen mit Latexpartikeln gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Sek. Bei RT wurde die Lösung gut gemischt und der Isotypisierungstreifen in die Lösung gehalten. Nach 5-10 Min. konnte das Ergebnis der Isotypisierung abgelesen werden.

4.5.2 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) zur quantitativen Bestimmung der Antikörperkonzentration

Die Konzentration des sezernierten Antikörpers im Zellkulturüberstand konnte über einen Sandwich-ELISA (Abbildung 4-1) mit einem Sensitivitätsbereich von 1,5-50 ng/mL quantifiziert werden. Der Beschichtungsantikörper, der die konstante Region der schweren Kette des zu quantifizierenden Antikörpers spezifisch bindet, wurde auf einer polymeren Matrix unspezifisch adsorptiv gebunden. Um unspezifische Bindungen weiteren Antikörper zu verhindern, wurden freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Bei der Inkubation des zu quantifizierenden Antikörpers wurde dieser spezifisch vom Beschichtungsantikörper gebunden und durch ein enzymgekoppeltes Antikörperkonjugat spezifisch detektiert. Durch Zugabe einer Substrat-Lösung entstand durch die enzymatische Reaktion ein photometrisch

quantifizierbarer Farbumschlag, wobei die gebundene Enzymmenge proportional zur Konzentration des zu messenden Antikörpers war.

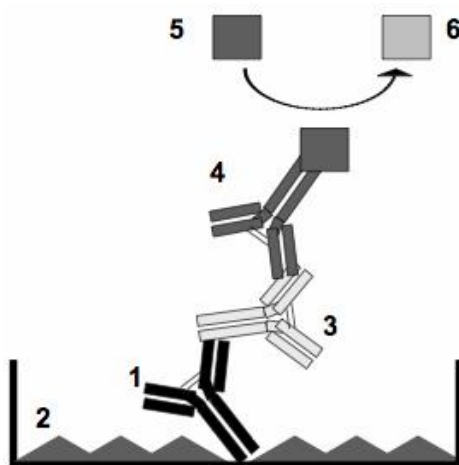


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA Verfahrens. Nach der Adsorption des Beschichtungsantikörpers (1) an die MaxiSorp® 96-Napf Flachbodenplatte folgte der Blockierungsschritt, in dem die weitere unspezifische Bindung an die Mikrotiterplatte durch BSA verhindert wurde (2). Auf den anschließenden Auftrag der zu bestimmenden IgG-Probe (3) folgte die Inkubation mit IgG-Peroxidase (POD)-Konjugat. Das Enzym POD setzte das im folgenden Schritt aufgetragene farblose Substrat TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin, 5) zu einem blauen Stoff um, der nach Abstoppen der Reaktion durch Phosphorsäure einen Farbumschlag zu gelb zeigte (6). Die Extinktion wurde bei 450 nm im Plattenphotometer gemessen.

Der ELISA-Test wurde in einer MaxiSorp® 96-Napf Flachbodenplatte durchgeführt. Zur Bindung des Beschichtungsantikörpers wurden in jeden Napf 50 µL Antikörperlösung in Bicarbonat-Carbonat-Puffer (5 µg/mL) aufgetragen. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Näpfe zweimal mit je 350 µL Waschpuffer (1x PBS 0,05 % Tween 20) gewaschen. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurden dann die Vertiefungen mit je 350 µL 1x PBS 1 % BSA befüllt und erneut 2 Std. bei RT inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen wurden die zu bestimmenden Proben in entsprechenden Verdünnungen (standardmäßig unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8) angesetzt, mit 50 µL je Napf im Doppelansatz aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Antikörperstandard in den Konzentrationen 1,5 -50 ng/mL aufgetragen und die ELISA-Platte für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen und die gebundenen Antikörperproben mit je 50 µL Detektionsantikörper-Lösung für eine Std. bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Substrat (100 µL TMB pro Napf) zugegeben, die enzymatische Reaktion nach maximal 15 Min. mit 100 µL 1M H₃PO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm

photometrisch bestimmt. Die relative Konzentration der gemessenen Proteine wurde im ELISA über den Logarithmus der Absorption der Proben bei OD₄₅₀ mittels einer Regressionsgerade des linearen Typs, die an den Logarithmus der Absorption der Standardreihe aus Referenz-Antikörper (1,5-50 ng/mL) angelehnt ist, rechnerisch ermittelt.

4.5.3 Southern Blot Analyse zur Bestimmung der Genkopienzahl

Die Southern Blot Analyse wurde mit dem nicht-radioaktiven DIG System der Firma Roche in Anlehnung an das Benutzerhandbuch durchgeführt.

4.5.3.1 Präparation der Sonden

Die Sonden wurden mittels Roche DIG PCR Labeling Kit in einer spezifischen PCR-Reaktion nach Herstellerangaben generiert, um eine hocheffiziente DIG-Markierung zu erzielen. Verwendet wurden Sonden mit einer Fragmentgröße von 400 bis 600 bp, die im analytischen Agarose-Gel qualitativ bewertet wurden.

4.5.3.2 Transfer und Fixierung

Im Southern Blot Verfahren wurde die restriktionsverdaute genomische DNA und der entsprechende DIG-markierte Größenstandard im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3-4 h bei 90-110 V). Lange Fragmente (>5 kb) wurden vor dem Transfer mittels 0,25 M HCl für ca. 10 min depurinisiert, so dass sie während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfielen und leichter aus dem Gel austreten konnten. Das Gel wurde denaturiert (0,4 N NaOH) und durch Kapillartransfer über Nacht unter denaturierenden Bedingungen auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Dazu wurde das Gel in die Blotapparatur überführt: es lag mit der Unterseite nach oben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatman 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0,4 M NaOH) eintauchten. Unter dem Filterpapier sollten mehrere Lagen Filterpapier liegen, die nicht mit der Flüssigkeit in Berührung standen. Auf das Gel wurde die Nylonmembran gelegt, die zuvor in 0,4 M NaOH befeuchtet wurde. Luftblasen zwischen Gel und Membran waren sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran wurden zwei Lagen mit 0,4 M NaOH angefeuchtetes und eine Lage trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schloss ein Stapel saugfähiges Papier (z.B. „Tork“) die Anordnung ab. Die Apparatur wurde vorsichtig mit einer Glasplatte und einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert.



Abbildung 4-2: Aufbau der Southern Blotapparatur. A=mit 0,4 N NaOH befülltes Pufferreservoir; B=Träger mit 2 feuchten Filterpapieren; C=langes Filterpapier, dessen Enden in das Pufferreservoir eintauchen; D=Gel, Unterseite nach oben; E=feuchte Nylonmembran und Filterpapier; F=Lage trockenes Filterpapier; G=Glasplatte; H=Gewicht von ca. 500 g.

Der Transfer sollte mindestens 6 Std., meist jedoch über Nacht erfolgen. Bei Durchfeuchtung sollte der Papierstapel gewechselt werden. Anschließend wurde die Nylonfolie in 2x SSC neutralisiert, 2 Std. bei 80 °C fixiert und zur Hybridisierung weiterverwendet.

4.5.3.3 Hybridisierung

Die Membranen mit der fixierten DNA wurden in verschlossenen Hybridisierungsröhren 0,5 Std. bei 42 °C in Prähybridisierungslösung (DIG Easy Hyb) inkubiert. Die verdünnten Sonden (4 µL + 46 µL dH₂O) wurden für 5 Min. im Heizblock bei 100 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 10 mL frischer Prähybridisierungslösung zur Hybridisierungslösung verdünnt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 45 °C. Am nächsten Tag wurden die Blots zunächst für 5 Min. bei RT in 2x SSC 0,1 % SDS, dann für 2 x 15 Min. in auf 60 °C vorgeheiztem 0,5x SSC 0,1 % SDS gewaschen.

4.5.3.4 Detektion

Die Detektion der DIG-markierten DNA wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Membranen wurden in Waschpuffer equilibriert und 0,5-3 Std. in Blocking-Lösung im Hybridisierungsbeutel inkubiert. Der Anti-Digoxigenin-AP-Antikörper wurde abzentrifugiert (10.000 rpm, 5 Min.), 1:10.000 in 20 mL Blockinglösung verdünnt und nach Entfernen der Blockinglösung auf die Blots gegeben. Nach 0,5 Std. wurden die Membranen zweimal für 15 Min. mit Waschpuffer im Beutel gewaschen und anschließend für 3 Min. in 20 mL Detektionspuffer equilibriert. Pro Membran wurden 4 mL Substratlösung (CDP-Star 1:100 in

Detektionspuffer) für 5 Min. im Dunkeln im Beutel inkubiert, die überschüssige Flüssigkeit durch Ausstreichen entfernt, der Beutel wurde ohne Blasenbildung verschweißt und in der Expositionskassette fixiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden durch unterschiedlich lange Belichtungszeiten von Filmen dokumentiert.

4.5.3.5 Stripping von Membranen und Reinkubation von Hybridisierungslösungen

Detektierte Membranen konnten nach Stripping auch mit unterschiedlichen Sonden bewertet werden. Dazu wurde die Membran für 1 Min. in dH₂O geschwenkt, zweimal 15 Min. bei 37 °C in 0,2 M NaOH 0,1 % SDS (Stripping-Buffer) und anschließend 5 Min. in 2x SSC gewaschen und erneut in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Bereits verwendete Hybridisierungslösung konnte durch Denaturierung der Sonde für 10 Min. bei 68 °C bis zu fünfmal wieder verwendet werden.

4.5.4 Kopplung von PE-Antikörperkonjugaten

Das dialysierte R-Phycoerythrin (PE) wurde im molaren Verhältnis von 7,5:1 mit SMCC aktiviert, der Antikörper mit 20 mM DTT reduziert und über eine Sephadex G25-Säule in den Kopplungspuffer umgepuffert. Die Kopplung erfolgte mit einem molaren Verhältnis von 1:2, d.h. je 1 mg reduziertem Antikörper wurden 3,2 mg aktiviertes PE ($6,7 \times 10^{-6}$ mmol Antikörper zu $13,3 \times 10^{-6}$ mmol PE) zur Kopplung eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 1 Std. bei RT im, und wurde danach mit 2 µL 50 mM β-Mercaptoethanol (ME) pro mg Antikörper ebenfalls für 20 min. bei RT abgestoppt, wobei das ME mit den freien Maleimidgruppen reagiert. Anschließend wurden 30 µg NEM pro mg Antikörper zugeben, welches mit freien SH-Gruppen reagiert. Das Konjugat wurde dann über PD-10-Säulen aufreingt, bei 13.000 rpm für 15 Min. abgefügt, der Überstand abgenommen und die OD gemessen.

4.5.5 Immuncytochemische Färbung von Zellen

2×10^5 bis 1×10^6 Zellen wurden nach Ernte einmal in 1 mL PEB gewaschen (100 x g, 4 °C, 10 Min.), der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µL der entsprechenden Antikörperkonjugat-Lösung im durch den Hersteller angegebenen Titer resuspendiert und für 5 min. auf Eis inkubiert. 1 mL PEB wurde zugegeben und die Suspension gewaschen (100 x g, 4 °C, 10 Min.), der Überstand im Anschluss verworfen. Im Falle der Färbung mit einem Direktkonjugat wurde das Pellet im gewünschten Volumen PEB resuspendiert und

durchflusszytometrisch analysiert. Im Falle einer indirekten Färbung mit zwei Antikörpern erfolgte auf den Waschschrift ein weiterer Färbeschritt mit dem Sekundärkonjugat. Nach dem Auswaschen der Färbelösung konnte das Pellet in PEB zur Analyse resuspendiert werden.

4.5.6 „Antibody CHO Capture System“

4.5.6.1 Detektion

1×10^6 Zellen wurden nach der Ernte gewaschen ($100 \times g$, $4^\circ C$, 10 Min.) und in $100 \mu L$ mit der Fangmatrixlösung in Kulturmedium resuspendiert und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz in ein 15-mL-Reaktionsröhrchen in 10 mL vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Zur Sekretion wurde der Ansatz für 1 Std. bei $37^\circ C$ auf dem MACSMix inkubiert, im Anschluss für 10 Min. auf Eis heruntergekühlt und pelletiert ($100 \times g$, $4^\circ C$, 10 Min.). Das Pellet wurde in der Detektions-Antikörperlösung in PEB-Puffer resuspendiert, für 10 Min. auf Eis inkubiert und dann erneut gewaschen ($100 \times g$, $4^\circ C$, 10 Min.). Die Probe wurde in $250 \mu L$ PEB resuspendiert, tote Zellen durch Zugabe von PI gefärbt und eine durchflusszytometrische Analyse im MACSQuant durchgeführt.

4.5.6.2 Anreicherung

Um Antikörper-sezernierende Zellen mittels MACS anzureichern, wurden 1×10^7 Zellen wie oben im jeweils zehnfachen Volumen gefärbt und die Sekretionsphase in 50 mL Kulturmedium durchgeführt. Für die mit dem Detektionskonjugat gefärbten Zellen erfolgte die Inkubation mit der Microbead-Konjugat-Lösung in 1 mL PEB für 15 Min. auf Eis, danach wurden die Zellen gewaschen ($100 \times g$, $4^\circ C$, 10 Min.), in $500 \mu L$ resuspendiert und zunächst $100 \mu L$ der Suspension als Probe „Ori“ entnommen. Pro Ansatz wurden zwei MS-Säulen benötigt. Die erste Säule wurde ins Magnetfeld eingesetzt, mit $500 \mu L$ PEB equilibriert und der Ansatz aufgetragen. Die Säule wurde dreimal mit je $500 \mu L$ PEB gewaschen und der gesamte Durchlauf von Auftrag und Waschschriften vereinigt (Probe N1). Eine zweite MS-Säule wurde wie oben equilibriert und die Elution der ersten Säule nach deren Entnahme aus dem Magnetfeld mit Hilfe des Stempels in 1 mL PEB auf die zweite Säule durchgeführt. Die zweite Säule wurde ins Magnetfeld eingesetzt und einmal mit $500 \mu L$ PEB gewaschen (Probe N2). Die Elution der Säule nach Entnahme aus dem Magneten erfolgte mittels Stempel in 1 mL Kulturmedium in eine Zellkulturplatte (Probe E2). Zur Analyse wurden hier

100 μ L der Suspension entnommen und alle Fraktionen im MACSQuant durchflusszytometrisch analysiert.

5 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
<i>amp</i>	Ampicillinresistenz-Gen
aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
CD	„cluster of differentiation“
CHO	Chinesische Hamstero-var-Zellen
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N ersetzt Adenosin, Cytidin, Guanosin, Thymidin)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EGFP-mHc	Fusionsprotein aus EGFP und dem konstanten Bereich der schweren Kette des Maus-IgG1
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“
FCS	fetales Kälberserum
Flp	Flp-Rekombinase
FlpO	Flp-Rekombinase, codon-optimized
FRT	Flp recognition target
g	Gramm
G	Guanin
G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
GFP	„green fluorescent protein“, Grün-fluoreszierendes Protein
GOI	„gene of interest“, Gen von Interesse
GS	Glutaminsynthetase
HAT	Histon-Acetyltransferase

HC	schwere Antikörperkette
<i>hcmv</i>	humaner Cytomegalievirus-Promotor
HDAC	Histon-Deacetylase
hum.IgG	Humanisiertes Immunglobulin G
<i>hygk</i>	Hygromycin-Thymidinkinase-Fusionsgen
IRES	„internal ribosomal entry site“
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LC	leichte Antikörperkette
M	molar
mA	Milliampère
MACS®	„Magnetic Cell Sorting“
MAR	Matrix Attachment Region
MCS	Multiple Cloning Site
mIgG	Murines Immunglobulin G
Min.	Minute
mL	Milliliter
MQ	MACSQuant, Durchflussscytometer
mRNA	messenger-RNA
MSX	Methionin-Sulphoximin
MTX	Methotrexat
neo	Neomycin-Phosphotransferase
ng	Nanogramm
nm	10 ⁻⁹ Meter
OD	optische Dichte
p	Plasmid
PBS	Phosphate-buffered Saline
pcd	Picogramm/Zelle/Tag; Einheit der spezifischen Produktionsrate
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythin
pg	Picogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
pmol	10 ⁻¹² Mol
RMCE	„Recombinase-Mediated Cassette Exchange“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S/MAR	Scaffold/Matrix Attachment Region
SAR	Scaffold Attachment Region

Abkürzungsverzeichnis

Sek.	Sekunde
SIDD	Stress Induced Duplex Destabilization
SPR	Spezifische Produktionsrate
Std.	Stunde
SV40	Simian Virus 40
T	Thymidin
TAE	Tris-Azetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-Hydroxymehtyl-Aminomethan
U	Units, Einheit zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent)
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm

6 Literaturverzeichnis

- Abremski K, Hoess R, Sternberg N. 1983. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32:1301-1311.
- Akselband Y, Moen PT, Jr., McGrath P. 2003. Isolation of rare isotype switch variants in hybridoma cell lines using an agarose gel microdrop-based protein secretion assay. *Assay Drug Dev Technol* 1:619-626.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1998. *Essential Cell Biology. An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. New York, London: Garland Publishing, Inc.
- Alt FW, Kellems RE, Bertino JR, Schimke RT. 1978. Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J Biol Chem* 253:1357-1370.
- Antoniou M, Harland L, Mustoe T, Williams S, Holdstock J, Yague E, Mulcahy T, Griffiths M, Edwards S, Ioannou PA, Mountain A, Crombie R. 2003. Transgenes encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and HNRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing. *Genomics* 82:269-279.
- Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kalionis B, Narayana SV, Pierson LS, 3rd, et al. 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *Embo J* 5:433-440.
- Artelt P, Grannemann R, Stocking C, Friel J, Bartsch J, Hauser H. 1991. The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells. *Gene* 99:249-254.
- Atkins J, Odum J, Webb M, Crossley L. 2007. In: Dutton RL, Scharer JM, editors. *Advanced Technologies in Biopharmaceutical Processing*: Wiley-Blackwell Publishing.
- Baer A, Bode J. 2001. Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr Opin Biotechnol* 12:473-480.
- Baer A, Schübeler D, Bode J. 2000. Transcriptional properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection. *Biochemistry* 39:7041-7049.
- Bailey CG, Tait AS, Sunstrom NA. 2002. High-throughput clonal selection of recombinant CHO cells using a dominant selectable and amplifiable metallothionein-GFP fusion protein. *Biotechnol Bioeng* 80:670-676.
- Barnes LM, Bentley CM, Dickson AJ. 2000. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology* 32:109-123.
- Barnes LM, Bentley CM, Dickson AJ. 2003. Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 81:631-639.
- Barnes LM, Dickson AJ. 2006. Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression. *Curr Opin Biotechnol* 17:381-386.
- Bebbington CR, Renner G, Thomson S, King D, Abrams D, Yarranton GT. 1992. High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Biotechnology (N Y)* 10:169-175.
- Becker E, Florin L, Pfizenmaier K, Kaufmann H. 2008. An XBP-1 dependent bottle-neck in production of IgG subtype antibodies in chemically defined serum-free Chinese hamster ovary (CHO) fed-batch processes. *J Biotechnol* 135:217-223.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G. 2001. Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic. *Science* 291:447-450.
- Benham C, Kohwi-Shigematsu T, Bode J. 1997. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol* 274:181-196.

- Benton T, Chen T, McEntee M, Fox B, King D, Crombie R, Thomas TC, Bebbington C. 2002. The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein. *Cytotechnology* 38:43-46.
- Berezney R, Coffey DS. 1974. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 60:1410-1417.
- Berezney R, Mortillaro MJ, Ma H, Wei X, Samarabandu J. 1995. The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol* 162A:1-65.
- Berrios M, Osheroff N, Fisher PA. 1985. In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4142-4146.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bishop J. 1999. *Transgenic Mammals*. England: Pearson Education Limited.
- Bode J, Benham C, Knopp A, Mielke C. 2000a. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10:73-90.
- Bode J, Goetze S, Heng H, Krawetz SA, Benham C. 2003a. From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. *Chromosome Res* 11:435-445.
- Bode J, Götze S, Ernst E, Hüsemann Y, Baer A, Seibler J, Mielke C. 2003b. Architecture and utilization of highly expressed genomic sites. In: Markrides SC, editor. *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*: Elsevier.
- Bode J, Kohwi Y, Dickinson L, Joh T, Klehr D, Mielke C, Kohwi-Shigematsu T. 1992. Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* 255:195-197.
- Bode J, Maass K. 1988. Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* 27:4706-4711.
- Bode J, Pucher HJ, Maass K. 1986. Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon-beta genes in a mouse host cell. *Eur J Biochem* 158:393-401.
- Bode J, Schlake T, Iber M, Schubeler D, Seibler J, Snezhkov E, Nikolaev L. 2000b. The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol Chem* 381:801-813.
- Bolhuis A, Tjalsma H, Smith HE, de Jong A, Meima R, Venema G, Bron S, van Dijk JM. 1999. Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 65:2934-2941.
- Bonifacio JS, Dell'Angelica EC, Springer TA. 2001. Immunoprecipitation. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 9:Unit 9 8*.
- Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. 1972. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 43:404-409.
- Borghesi L, Milcarek C. 2006. From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. *Immunol Res* 36:27-32.
- Borth N, Strutzenberger K, Kunert R, Steinfeldner W, Katinger H. 1999. Analysis of changes during subclone development and ageing of human antibody-producing heterohybridoma cells by northern blot and flow cytometry. *J Biotechnol* 67:57-66.
- Borth N, Zeyda M, Kunert R, Katinger H. 2000. Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnol Bioeng* 71:266-273.
- Brezinsky SC, Chiang GG, Szilvasi A, Mohan S, Shapiro RI, MacLean A, Sisk W, Thill G. 2003. A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *J Immunol Methods* 277:141-155.
- Broach JR, Hicks JB. 1980. Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ circle. *Cell* 21:501-508.

- Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. 1998. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* 16:657-662.
- Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F, Stewart AF. 1996. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 24:4256-4262.
- Burdon MG, Lees JH. 1985. Double-strand cleavage at a two-base deletion mismatch in a DNA heteroduplex by nuclease S1. *Biosci Rep* 5:627-632.
- Busch M. 2005a. Klonierung und transiente Expression von rekombinanten murinen und chimären anti-CD303-Antikörpern. Diplomarbeit. Fachhochschule Jülich.
- Busch M. 2005b. Klonierung und transiente Expression von rekombinanten murinen und chimären anti-CD303-Antikörpern. In: Fachhochschule Jülich.
- Butler M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:283-291.
- Capecchi M. 1990. Gene targeting. How efficient can you get? *Nature* 348:109.
- Caron AW, Nicolas C, Gaillet B, Ba I, Pinard M, Garnier A, Massie B, Gilbert R. 2009. Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins. *BMC Biotechnol* 9:42.
- Carroll D. 2008. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther* 15:1463-1468.
- Cesari F, Rennekampff V, Vintersten K, Vuong LG, Seibler J, Bode J, Wiebel FF, Nordheim A. 2004. Elk-1 knock-out mice engineered by Flp recombinase-mediated cassette exchange. *Genesis* 38:87-92.
- Chen L, Xie Z, Teng Y, Wang M, Shi M, Qian L, Hu M, Feng J, Yang X, Shen B, Guo N. 2004. Highly efficient selection of the stable clones expressing antibody-IL-2 fusion protein by a dicistronic expression vector containing a mutant neo gene. *J Immunol Methods* 295:49-56.
- Clarke HRG, Compton BJ. 2008. Comparing Mammalian Expression Systems. *BioProcess International*:24-32.
- Cobellis G, Nicolaus G, Iovino M, Romito A, Marra E, Barbarisi M, Sardiello M, Di Giorgio FP, Iovino N, Zollo M, Ballabio A, Cortese R. 2005. Tagging genes with cassette-exchange sites. *Nucleic Acids Res* 33:e44.
- Cockerill PN, Garrard WT. 1986. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44:273-282.
- Coroadinha AS, Schucht R, Gama-Norton L, Wirth D, Hauser H, Carrondo MJ. 2006. The use of recombinase mediated cassette exchange in retroviral vector producer cell lines: predictability and efficiency by transgene exchange. *J Biotechnol* 124:457-468.
- Cuisset L, Tichonicky L, Delpech M. 1998. A protein phosphatase is involved in the inhibition of histone deacetylation by sodium butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 246:760-764.
- de Belle I, Cai S, Kohwi-Shigematsu T. 1998. The genomic sequences bound to special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) in vivo in Jurkat T cells are tightly associated with the nuclear matrix at the bases of the chromatin loops. *J Cell Biol* 141:335-348.
- DeMaria CT, Cairns V, Schwarz C, Zhang J, Guerin M, Zuenka E, Estes S, Karey KP. 2007. Accelerated clone selection for recombinant CHO CELLS using a FACS-based high-throughput screen. *Biotechnol Prog* 23:465-472.
- Derouazi M, Martinet D, Besuchet Schmutz N, Flaction R, Wicht M, Bertschinger M, Hacker DL, Beckmann JS, Wurm FM. 2006. Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 340:1069-1077.
- Di Domenico AI, Christodoulou I, Pells SC, McWhir J, Thomson AJ. 2008. Sequential genetic modification of the hprt locus in human ESCs combining gene targeting and recombinase-mediated cassette exchange. *Cloning Stem Cells* 10:217-230.

- Dillon N, Festenstein R. 2002. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* 18:252-258.
- Dinnis DM, Stansfield SH, Schlatter S, Smales CM, Alete D, Birch JR, Racher AJ, Marshall CT, Nielsen LK, James DC. 2006. Functional proteomic analysis of GS-NS0 murine myeloma cell lines with varying recombinant monoclonal antibody production rate. *Biotechnol Bioeng* 94:830-841.
- Fackelmayer FO, Dahm K, Renz A, Ramsperger U, Richter A. 1994. Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur J Biochem* 221:749-757.
- Fann CH, Guirgis F, Chen G, Lao MS, Piret JM. 2000. Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 69:204-212.
- Foster KA, Collins JM. 1985. The interrelation between DNA synthesis rates and DNA polymerases bound to the nuclear matrix in synchronized HeLa cells. *J Biol Chem* 260:4229-4235.
- Gaines P, Wojchowski DM. 1999. pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells. *Biotechniques* 26:683-688.
- Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. 2008. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Immunol* Chapter 8:Unit 8 10.
- Garrick D, Fiering S, Martin DI, Whitelaw E. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet* 18:56-59.
- Gasser SM, Laemmli UK. 1987. Improved methods for the isolation of individual and clustered mitotic chromosomes. *Exp Cell Res* 173:85-98.
- Gasser SM, Laroche T, Falquet J, Boy de la Tour E, Laemmli UK. 1986. Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol* 188:613-629.
- Girod PA, Nguyen DQ, Calabrese D, Puttini S, Grandjean M, Martinet D, Regamey A, Saugy D, Beckmann JS, Bucher P, Mermoud N. 2007. Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells. *Nat Methods* 4:747-753.
- Girod PA, Zahn-Zabal M, Mermoud N. 2005. Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng* 91:1-11.
- Givan AL. 2001. Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biol* 63:19-50.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7380-7384.
- Gorman CM, Howard BH, Reeves R. 1983. Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate. *Nucleic Acids Res* 11:7631-7648.
- Graf A, Dragosits M, Gasser B, Mattanovich D. 2009. Yeast systems biotechnology for the production of heterologous proteins. *FEMS Yeast Res* 9:335-348.
- Gubin AN, Reddy B, Njoroge JM, Miller JL. 1997. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 236:347-350.
- Hanania EG, Fieck A, Stevens J, Bodzin LJ, Palsson BO, Koller MR. 2005. Automated in situ measurement of cell-specific antibody secretion and laser-mediated purification for rapid cloning of highly-secreting producers. *Biotechnol Bioeng* 91:872-876.
- Hendzel MJ, Delcuve GP, Davie JR. 1991. Histone deacetylase is a component of the internal nuclear matrix. *J Biol Chem* 266:21936-21942.
- Hendzel MJ, Sun JM, Chen HY, Rattner JB, Davie JR. 1994. Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J Biol Chem* 269:22894-22901.
- Heyman B. 1996. Complement and Fc-receptors in regulation of the antibody response. *Immunol Lett* 54:195-199.
- Hirata R, Chamberlain J, Dong R, Russell DW. 2002. Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol* 20:735-738.
- Hoch ASH. 2005. Selektion und Anreicherung von Hybridom-Zellklonen mit hoher spezifischer Antikörperproduktionsrate. In: Bergisch Gladbach: Universität zu Köln.

- Hockney RC. 1994. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 12:456-463.
- Hoeijmakers JH. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.
- Hoess R, Abremski K, Sternberg N. 1984. The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 49:761-768.
- Hoess RH, Ziese M, Sternberg N. 1982. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3398-3402.
- Holmes P, Al-Rubeai M. 1999. Improved cell line development by a high throughput affinity capture surface display technique to select for high secretors. *J Immunol Methods* 230:141-147.
- Hornbeck P, Winston SE, Fuller SA. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *Curr Protoc Mol Biol Chapter 11:Unit11 12*.
- Huang Y, Li Y, Wang YG, Gu X, Wang Y, Shen BF. 2007. An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. *J Immunol Methods* 322:28-39.
- Huber R. 1980. Spatial structure of immunoglobulin molecules. *Klin Wochenschr* 58:1217-1231.
- Jackson AT. 1993. *Verfahrenstechnik in der Biotechnologie*. Berlin: Springer Verlag.
- James E, Lee JM. 2001. The production of foreign proteins from genetically modified plant cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 72:127-156.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2002. *Immunologie*. Elsevier: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jenkins N, Curling EM. 1994. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb Technol* 16:354-364.
- Jenuwein T. 2001. Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol* 11:266-273.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
- Jiang Z, Huang Y, Sharfstein ST. 2006. Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression. *Biotechnol Prog* 22:313-318.
- Jiang Z, Sharfstein ST. 2008. Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility. *Biotechnol Bioeng* 100:189-194.
- Jones SD. 2007. Recent Advances in Antibody Development. In: *BIO 2007*. Boston, MA.
- Jones SD, Castillo FJ, Levine HL. 2007. Advances in the Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *BioPharm International* 20:96-114.
- Kaufman WL, Kocman I, Agrawal V, Rahn HP, Besser D, Gossen M. 2008. Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation. *Nucleic Acids Res* 36:e111.
- Kaufmann H, Fussenegger M. 2003. Metabolic engineering of mammalian cells for higher protein yield. In: Markrides SC, editor. *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*: Elsevier.
- Kim JM, Kim JS, Park DH, Kang HS, Yoon J, Baek K, Yoon Y. 2004. Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions. *J Biotechnol* 107:95-105.
- Kim MS, Lee GM. 2008. Use of Flp-mediated cassette exchange in the development of a CHO cell line stably producing erythropoietin. *J Microbiol Biotechnol* 18:1342-1351.
- Kim NS, Byun TH, Lee GM. 2001. Key determinants in the occurrence of clonal variation in humanized antibody expression of cho cells during dihydrofolate reductase mediated gene amplification. *Biotechnol Prog* 17:69-75.
- Kim NS, Kim SJ, Lee GM. 1998a. Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified Chinese hamster ovary cells: stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng* 60:679-688.

- Kim SJ, Kim NS, Ryu CJ, Hong HJ, Lee GM. 1998b. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng* 58:73-84.
- Klehr D, Maass K, Bode J. 1991. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* 30:1264-1270.
- Klehr D, Schlake T, Maass K, Bode J. 1992. Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry* 31:3222-3229.
- Knipppers R. 2006. *Molekulare Genetik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kornberg RD. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868-871.
- Kornberg RD, Thomas JO. 1974. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184:865-868.
- Kuhn R, Schwenk F. 1997. Advances in gene targeting methods. *Curr Opin Immunol* 9:183-188.
- Larrick JW, Thomas DW. 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr Opin Biotechnol* 12:411-418.
- Lattenmayer C, Loeschel M, Schriebl K, Steinfeldner W, Sterovsky T, Trummer E, Vorauer-Uhl K, Muller D, Katinger H, Kunert R. 2007. Protein-free transfection of CHO host cells with an IgG-fusion protein: selection and characterization of stable high producers and comparison to conventionally transfected clones. *Biotechnol Bioeng* 96:1118-1126.
- Lauth M, Spreafico F, Dethleffsen K, Meyer M. 2002. Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res* 30:e115.
- Lee C, Ly C, Sauerwald T, Kelly T, Moore G. 2006. High-Throuput Screening of Cell Lines Expressing Monoclonal Antibodies. *BioProcess International* 4:32-35.
- Lewis CD, Lebkowski JS, Daly AK, Laemmli UK. 1984. Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures. *J Cell Sci Suppl* 1:103-122.
- Li J, Zhang C, Jostock T, Dubel S. 2007. Analysis of IgG heavy chain to light chain ratio with mutant Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site. *Protein Eng Des Sel* 20:491-496.
- Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M. 1998. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5172-5177.
- Liebich I, Bode J, Reuter I, Wingender E. 2002. Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs). *Nucleic Acids Res* 30:3433-3442.
- Lindl T. 2002. *Zell- und Gewebekultur*. Heidelberg.
- Liu X, Constantinescu SN, Sun Y, Bogan JS, Hirsch D, Weinberg RA, Lodish HF. 2000. Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels. *Anal Biochem* 280:20-28.
- Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, Ando D, Urnov FD, Galli C, Gregory PD, Holmes MC, Naldini L. 2007. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 25:1298-1306.
- Luderus ME, de Graaf A, Mattia E, den Blaauwen JL, Grande MA, de Jong L, van Driel R. 1992. Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 70:949-959.
- Luderus ME, den Blaauwen JL, de Smit OJ, Compton DA, van Driel R. 1994. Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 14:6297-6305.
- Makrides SC. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60:512-538.
- Makrides SC, Prentice HL. 2003. Why choose mammalian cells for protein production? In: Makrides SC, editor. *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*: Elsevier.

- Mancia F, Patel SD, Rajala MW, Scherer PE, Nemes A, Schieren I, Hendrickson WA, Shapiro L. 2004. Optimization of protein production in mammalian cells with a coexpressed fluorescent marker. *Structure* 12:1355-1360.
- Manz R, Assenmacher M, Pfluger E, Miltenyi S, Radbruch A. 1995. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1921-1925.
- Marder P, Maciak RS, Fouts RL, Baker RS, Starling JJ. 1990. Selective cloning of hybridoma cells for enhanced immunoglobulin production using flow cytometric cell sorting and automated laser nephelometry. *Cytometry* 11:498-505.
- Martin DI, Whitelaw E. 1996. The vagaries of variegating transgenes. *Bioessays* 18:919-923.
- Mastrangelo AJ, Hardwick JM, Zou S, Betenbaugh MJ. 2000. Part II. Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotechnol Bioeng* 67:555-564.
- Mattanovich D, Borth N. 2006. Applications of cell sorting in biotechnology. *Microb Cell Fact* 5:12.
- Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC, Kilian M, Wormald MR, Lellouch AC, Rudd PM, Woof JM, Dwek RA. 1998. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions. *J Biol Chem* 273:2260-2272.
- McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P. 1995. Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology (N Y)* 13:362-365.
- McLeod M, Craft S, Broach JR. 1986. Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle. *Mol Cell Biol* 6:3357-3367.
- Meidhof S. 2009. Characterisation and selection of CHO cells, which secrete humanized CD303 antibody, by developing a system on the basis of the affinity matrix technology. In: Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Meng YG, Liang J, Wong WL, Chisholm V. 2000. Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells. *Gene* 242:201-207.
- Mielke C, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T, Bode J. 1990. Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: correlation of properties in vitro and function in vivo. *Biochemistry* 29:7475-7485.
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238.
- Mirkovitch J, Gasser SM, Laemmli UK. 1988. Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J Mol Biol* 200:101-109.
- Mirkovitch J, Mirault ME, Laemmli UK. 1984. Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 39:223-232.
- Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. 2000. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 1:376-382.
- Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Jouvenot Y, DeKolver RC, Gregory PD, Umov FD, Holmes MC. 2007. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3055-3060.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Jolicoeur P, Massie B. 1997. Use of a dicistronic expression cassette encoding the green fluorescent protein for the screening and selection of cells expressing inducible gene products. *Biotechniques* 22:150-154, 156, 158-161.
- Nagy A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- Nanto K, Yamada-Watanabe K, Ebinuma H. 2005. Agrobacterium-mediated RMCE approach for gene replacement. *Plant Biotechnol J* 3:203-214.

- Nathans D, Notani G, Schwartz JH, Zinder ND. 1962. Biosynthesis of the coat protein of coliphage f2 by *E. coli* extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:1424-1431.
- Oumard A, Qiao J, Jostock T, Li J, Bode J. 2006. Recommended Method for Chromosome Exploitation: RMCE-based Cassette-exchange Systems in Animal Cell Biotechnology. *Cytotechnology* 50:93-108.
- Paulson JR, Laemmli UK. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12:817-828.
- Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F. 2002. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4489-4494.
- Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, June CH. 2008. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26:808-816.
- Pham CT, MacIvor DM, Hug BA, Heusel JW, Ley TJ. 1996. Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13090-13095.
- Philipps B, Forstner M, Mayr LM. 2004. Baculovirus expression system for magnetic sorting of infected cells and enhanced titer determination. *Biotechniques* 36:80-83.
- Porteus MH, Baltimore D. 2003. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 300:763.
- Potter H, Weir L, Leder P. 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7161-7165.
- Qiao J. 2005. Systematic Generation of Mammalian Production Cell Lines: Characterization and Re-use of Genomic Transgene Integration Sites. In: Technische Universität Braunschweig.
- Qiao J, Oumard A, Wegloehner W, Bode J. 2009. Novel tag-and-exchange (RMCE) strategies generate master cell clones with predictable and stable transgene expression properties. *J Mol Biol* 390:579-594.
- Rattan SI, Kristensen O. 1990. Continuous gene expression in vitro: the Spirin system. *Trends Biotechnol* 8:275-276.
- Raymond CS, Soriano P. 2007. High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS One* 2:e162.
- Reisinger H, Steinfeldner W, Stern B, Katinger H, Kunert R. 2008. The absence of effect of gene copy number and mRNA level on the amount of mAb secretion from mammalian cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:701-710.
- Rhoades RA, Pflanzner RG. 2002. Human Physiology: Thomson Learning.
- Richards EJ, Elgin SC. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108:489-500.
- Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311:532-537.
- Rosenfeld SA. 1999. Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. *Methods Enzymol* 306:154-169.
- Santiago Y, Chan E, Liu PQ, Orlando S, Zhang L, Urnov FD, Holmes MC, Guschin D, Waite A, Miller JC, Rebar EJ, Gregory PD, Klug A, Collingwood TN. 2008. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5809-5814.
- Sauer B. 1992. Identification of cryptic lox sites in the yeast genome by selection for Cre-mediated chromosome translocations that confer multiple drug resistance. *J Mol Biol* 223:911-928.

- Sauer B. 1996. Multiplex Cre/lox recombination permits selective site-specific DNA targeting to both a natural and an engineered site in the yeast genome. *Nucleic Acids Res* 24:4608-4613.
- Sautter K, Enenkel B. 2005. Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity. *Biotechnol Bioeng* 89:530-538.
- Schaft J, Ashery-Padan R, van der Hoeven F, Gruss P, Stewart AF. 2001. Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. *Genesis* 31:6-10.
- Schlake T, Bode J. 1994. Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33:12746-12751.
- Schlake T, Klehr-Wirth D, Yoshida M, Beppu T, Bode J. 1994. Gene expression within a chromatin domain: the role of core histone hyperacetylation. *Biochemistry* 33:4197-4206.
- Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, Barnett S, Capecchi MR. 2000. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13702-13707.
- Schübeler D, Mielke C, Bode J. 1997. Excision of an integrated provirus by the action of FLP recombinase. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33:825-830.
- Schucht R, Coroadinha AS, Zanta-Boussif MA, Verhoeven E, Carrondo MJ, Hauser H, Wirth D. 2006. A new generation of retroviral producer cells: predictable and stable virus production by Flp-mediated site-specific integration of retroviral vectors. *Mol Ther* 14:285-292.
- Seibler J, Bode J. 1997. Double-reciprocal crossover mediated by FLP-recombinase: a concept and an assay. *Biochemistry* 36:1740-1747.
- Seibler J, Schubeler D, Fiering S, Groudine M, Bode J. 1998. DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: an efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry* 37:6229-6234.
- Sen S, Hu WS, Srien F. 1990. Flow cytometric study of hybridoma cell culture: correlation between cell surface fluorescence and IgG production rate. *Enzyme Microb Technol* 12:571-576.
- Senecoff JF, Cox MM. 1986. Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing. *J Biol Chem* 261:7380-7386.
- Sharfstein ST. 2008. Advances in cell culture process development: tools and techniques for improving cell line development and process optimization. *Biotechnol Prog* 24:727-734.
- Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. 2001. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* 19:751-755.
- Singh GB, Kramer JA, Krawetz SA. 1997. Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res* 25:1419-1425.
- Sleiman RJ, Gray PP, McCall MN, Codamo J, Sunstrom NA. 2008. Accelerated cell line development using two-color fluorescence activated cell sorting to select highly expressing antibody-producing clones. *Biotechnol Bioeng* 99:578-587.
- Strutzenberger K, Borth N, Kunert R, Steinfellner W, Katinger H. 1999. Changes during subclone development and ageing of human antibody-producing recombinant CHO cells. *J Biotechnol* 69:215-226.
- Taniguchi M, Sanbo M, Watanabe S, Naruse I, Mishina M, Yagi T. 1998. Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res* 26:679-680.
- Thammana P, Scharff MD. 1983. Immunoglobulin heavy chain class switch from IgM to IgG in a hybridoma. *Eur J Immunol* 13:614-619.
- Thyagarajan B, Guimaraes MJ, Groth AC, Calos MP. 2000. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 244:47-54.
- Tjio JH, Puck TT. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med* 108:259-268.

- Umlauf SW, Cox MM. 1988. The functional significance of DNA sequence structure in a site-specific genetic recombination reaction. *Embo J* 7:1845-1852.
- Urlaub G, Chasin LA. 1980a. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4216-4220.
- Urlaub G, Chasin LA. 1980b. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4216-4220.
- van Blokland HJ, Kwaks TH, Sewalt RG, Verhees JA, Klaren VN, Siersma TK, Korse JW, Teunissen NC, Botschuijver S, van Mer C, Man SY, Otte AP. 2007. A novel, high stringency selection system allows screening of few clones for high protein expression. *J Biotechnol* 128:237-245.
- Verwoerd TC, van Paridon PA, van Ooyen AJ, van Lent JW, Hoekema A, Pen J. 1995. Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves. *Plant Physiol* 109:1199-1205.
- Vidali G, Boffa LC, Bradbury EM, Allfrey VG. 1978. Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:2239-2243.
- Vogelstein B, Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:615-619.
- Volkert FC, Wilson DW, Broach JR. 1989. Deoxyribonucleic acid plasmids in yeasts. *Microbiol Rev* 53:299-317.
- Vooijs M, Jonkers J, Berns A. 2001. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep* 2:292-297.
- Wallace HA, Marques-Kranc F, Richardson M, Luna-Crespo F, Sharpe JA, Hughes J, Wood WG, Higgs DR, Smith AJ. 2007. Manipulating the mouse genome to engineer precise functional syntenic replacements with human sequence. *Cell* 128:197-209.
- Walsh G. 2006. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat Biotechnol* 24:769-776.
- Weidenfeld I, Gossen M, Low R, Kentner D, Berger S, Gorlich D, Bartsch D, Bujard H, Schonig K. 2009. Inducible expression of coding and inhibitory RNAs from retargetable genomic loci. *Nucleic Acids Res* 37:e50.
- Wirth D, Gama-Norton L, Schucht R, Nehlsen K, Hauser H. 2009. Site-Directed Engineering of Defined Chromosomal Sites for Recombinant Protein and Virus Expression. *BioPharm International*:32-39.
- Wirth M, Bode J, Zettlmeissl G, Hauser H. 1988. Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure. *Gene* 73:419-426.
- Wolffe AP, Pruss D. 1996. Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84:817-819.
- Woof JM, Burton DR. 2004. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol* 4:89-99.
- Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22:1393-1398.
- Wurm FM, Gwinn KA, Kingston RE. 1986. Inducible overproduction of the mouse c-myc protein in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5414-5418.
- Xiong KH, Liang QC, Xiong H, Zou CX, Gao GD, Zhao ZW, Zhang H. 2005. Expression of chimeric antibody in mammalian cells using dicistronic expression vector. *Biotechnol Lett* 27:1713-1717.
- Yasmin WG, Yunis JJ. 1974. Isolation of mammalian heterochromatin and euchromatin. *Methods Cell Biol* 8:151-177.